

Saila Parmes

Hermoston välittäjäainepitoisuuksien sähkökemialliseen mittaamiseen käytettävät elektrodit

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-insinöörin tutkintoa varten Espoossa 29.7.2011.

Työn valvoja:

Prof. Mervi Paulasto-Kröckel

Työn ohjaaja:

TkL Reeta Saukkonen

Tekijä: Saila Parmes

Työn nimi: Hermoston välittäjäainepitoisuuksien sähkökemialliseen mittaamiseen käytettävät elektrodit

Päivämäärä: 29.7.2011

Kieli: Suomi

Sivumäärä: 9+76

Elektroniikan laitos

Professori: Elektroniikan integrointi ja luotettavuus

Koodi: S-113

Valvoja: Prof. Mervi Paulasto-Kröckel

Ohjaaja: TkL Reeta Saukkonen

Työssä tutkittiin hermoston välittäjäainepitoisuuksien sähkökemialliseen mittaamiseen käytettäviä elektrodeja. Välittäjäainepitoisuuksien mittausten perusteella voidaan kehittää tehokkaampia hoitomenetelmiä neurologisille eli hermostollisille sairauksille, joiden hoitomuodot ovat tällä hetkellä vain oireita lieventäviä. Välittäjäaineiden mittaamiseen käytettävien anturien suurin haaste on niiden havaitsemisrajan alentaminen, jotta niillä voidaan havaita pieniäkin konsentraatiomuutoksia elimistössä ilman muiden aineiden vaikutusta mittaukseen. Työssä esitellään välittäjäaineiden ominaisuuksia ja yhteyksiä eri sairauksiin, sähkökemiallisia mittaamenetelmiä ja elektrodimateriaaliratkaisuja välittäjäaineiden mittaamiseksi ja muiden aineiden vasteiden poissulkemiseksi.

Työssä tutkittiin syklisellä voltammetrialla (SV) Nafion-polymeerillä pinnoitetun platinaelektrodin antamia vasteita. Nafion valittiin pinnoitteeksi, koska se pystyy estämään negatiivisesti varautuneiden aineiden pääsyn elektrodille. Siten sen tärkein tehtävä on rajata elektrodille pääseviä aineita. Mittaukset tehtiin *in vitro* fosfaatti-puskuroidussa suolaliuoksessa (PBS), johon lisättiin dopamiinia, jota haluttiin mitata, sekä askorbiinihappoa, joka usein häiritsee välittäjäaineiden mittauksia todellisessa fysiologisessa ympäristössä. SV valittiin mittaamenetelmäksi, sillä sen ajallinen resoluutio on parempi kuin muiden sähkökemiallisten mittaamenetelmien. Tuntemalla välittäjäaineiden hapettumisjännitteet, voidaan aineiden pitoisuudet määrittää SV:n virtavasteesta, kun aine hapettuu positiivisesti varautuneella työelektrodilla.

Tulosten perusteella Nafion-pinnoite elektrodilla auttoi pienentämään PBS-liuoksesta saatavia vasteita, kuten vedyn adsorptiota, desorptiota ja oksidin pelkistymistä. Nafion-pinnoite kuitenkin esti myös dopamiinin pääsyä elektrodille, eikä anturi havainnut dopamiinia yhtä herkästi kuin pinnoittamaton elektrodi. Sen sijaan askorbiinihapon lisäys nesteeseen ei vaikuttanut juurikaan Nafion-pinnoitettujen elektrodien vasteeseen, kun taas pinnoittamattomalla elektrodilla vaste nousi 70 %. Nafion-pinnoite siis auttoi askorbiinihapon aiheuttaman häiriön poistamisessa, mutta ei auttanut havaitsemaan dopamiinia yhtä herkästi kuin pinnoittamaton elektrodi.

Avainsanat: elektrodi, välittäjäaine, sähkökemialliset mittaamenetelmät, dopamiini, Nafion, syklinen voltammetria

Author: Saila Parmes

Title: Electrodes for measuring neurotransmitter concentrations with electrochemical techniques

Date: 29.7.2011

Language: Finnish

Number of pages: 9+76

Department of Electronics

Professorship: Electronics integration and reliability

Code: S-113

Supervisor: Prof. Mervi Paulasto-Kröckel

Instructor: Lic.Sc.(Tech.) Reeta Saukkonen

The focus of this work was in the electrodes that are used for measuring the concentrations of neurotransmitters with electrochemical techniques. Based on the measurement of the concentrations new treatments can be developed for neurological diseases, for which the treatments nowadays are only to relieve the symptoms. The biggest challenge is to decrease the limit of detection of the sensors used in the measurements. This is important to enable the measurement of the smallest changes of concentration without any interference from other molecules in the extracellular fluid. In this work the connections between neurotransmitters and diseases, the electrochemical measurement techniques and the electrode materials for measuring neurotransmitters and limiting the detection of other molecules were studied.

In this work Nafion coated platinum electrodes were studied with cyclic voltammetry (CV). Nafion was chosen for the coating material, as it repulses the negatively charged molecules and prevents them from reaching the electrode surface. The measurements were made in phosphate buffered saline (PBS). Dopamine and ascorbic acid were added to the solution to measure how they affect the response of the coated and uncoated electrodes. Dopamine acted as a model of positively charged and electroactive neurotransmitter and ascorbic acid as a normal interfering ion in the extracellular fluid. CV was chosen for the technique as its temporal resolution is better than with other electrochemical techniques. When a neurotransmitter oxidizes at the positively charged working electrode it can be seen as a change in measured current. By knowing the oxidation potentials of the neurotransmitters, they can be recognized from the cyclic voltammogram.

Based on the results, Nafion coating helped to decrease the responses of adsorption and desorption of hydrogen and reduction of oxide. It also prevented dopamine from getting to the electrode, and the coated electrode didn't detect dopamine as sensitively as the uncoated electrode. The addition of ascorbic acid in the solution didn't increase the response of the coated electrodes, but for the uncoated it increased by 70 %. To conclude, Nafion was effective in prohibiting the interference from ascorbic acid, but it didn't help to measure dopamine as sensitively as an uncoated electrode.

Keywords: electrode, neurotransmitter, electrochemical measurement techniques, dopamine, Nafion, cyclic voltammetry

Esipuhe

Haluan kiittää valvojaani professori Mervi Paulasto-Kröckeliä mahdollisuudesta tehdä diplomityö Elektroniikan integrointi ja luotettavuus -yksikössä, sekä kiinnostuksesta työtäni kohtaan ja kommentteista sen parantamiseksi. Oli ilo tehdä työ mielenkiintoisesta aiheesta, johon pääsin jo kandidaatintyössäni tutustumaan. Suuret kiitokset ansaitsee myös ohjaajaani Reeta Saukkonen, joka jaksoi ohjeistaa minua vielä työpaikan vaihdoksen jälkeen ja lomallaan niin työn rakenteen kuin yksityiskohtien hiomisessa. Lisäksi kiitokset ansaitsevat Antti Ritvanen ja Erika Gröhn avusta laboratoriotöissä, Vesa Vuorinen ja Juha Karppinen avusta ja ohjeistuksesta SEM-kuvantamisessa, Heikki Ruotoistenmäki ja Kimmo Rajala avusta elektrodien valmistuksessa, Riitta Viitala kaikesta avusta laboratoriossa sekä yksikön kesätyöntekijät Emilia Berg ja Betti Valmari avusta mittausten tekemisessä.

Lisäksi suuret kiitokset kuuluvat kaikille ystäväilleni ja perheelleni, jotka jaksoivat tukea minua koko prosessin aikana. Opiskeluvuodet Otaniemessä ovat olleet tähänastisen elämäni parhaita, ja opiskelu monien ihanien ystävien seurassa on auttanut minua pääsemään tähän asti. Kiitos teille. Lisäksi haluan kiittää erityisesti Äitiäni, joka jaksoi auttaa kaikessa mahdollisessa oikoluvusta ongelmanratkaisuun. Haluan kiittää myös Luisia, joka onnistui saamaan ajatukseni välillä pois työhön liittyvistä asioista.

Otaniemi, 29.7.2011

Saila Parmes

Sisältö

Tiivistelmä	ii
Tiivistelmä (englanniksi)	iii
Esipuhe	iv
Sisältö	v
Termistö ja lyhenteet	vi
Symbolit	vii
1 Johdanto	1
2 Hermoston välittäjäaineet	3
2.1 Tärkeimmät välittäjäaineet	5
2.1.1 Asetyylikoliini.....	5
2.1.2 Glutamiinihappo.....	6
2.1.3 Gamma-aminovoihappo.....	6
2.1.4 Dopamiini.....	6
2.1.5 Noradrenaliini	7
2.1.6 Serotoniini.....	7
2.2 Välittäjäaineiden vaikutukset sairauksiin	7
3 Välittäjäaineiden mittaaminen.....	10
3.1 Sähkökemialliset mittaussuomenetelmät	10
3.1.1 Amperometria	11
3.1.2 Kronoamperometria	12
3.1.3 Differentiaalipulssi-voltammetria	13
3.1.4 Syklinen voltammetria	14
3.2 Mittaukseen vaikuttavat välittäjäaineiden ominaisuudet	16
3.2.1 Välittäjäaineiden sähköinen varaus.....	16
3.2.2 Välittäjäaineiden sähköinen aktiivisuus.....	17
3.2.3 Välittäjäaineiden hapettumisjännite	19
3.3 Häiriötekijät mittauksessa	19
3.3.1 L-askorbiinihappo	20
3.3.2 Virtsahappo	20
4 Välittäjäaineiden mittaamiseen käytettävät elektrodit	21
4.1 Elektrodin vaatimukset ja materiaalit.....	21
4.1.1 Vaatimukset	22

Koko	22
Impedanssi	22
Bioyhteensopivuus	23
4.1.2 Käytettävät materiaalit	23
Platina ja kulta.....	23
Hiili	24
4.1.3 Pinnoitteet	27
Polypyrroli	27
PEDOT.....	27
Iridiumoksidi.....	27
4.2 Elektroodin selektiivisyyttä parantavat pinnoitteet	28
4.2.1 Pinnoiteratkaisut välittäjäaineittain.....	28
Asetyylikoliini.....	28
Glutamaatti.....	29
Gamma-aminovoihappo.....	31
Dopamiini.....	31
Noradrenaliini	32
Serotoniini.....	33
4.2.2 Nafion-pinnoite	33
5 Tutkimusmenetelmät.....	37
5.1 Elektrodien valmistus	37
5.1.1 Ensimmäisen erän elektrodit.....	37
5.1.2 Toisen erän elektrodit.....	38
5.2 Sähkökemialliset mittaukset syklisellä voltammetrialla	39
5.2.1 Mittaukset ensimmäisen erän elektrodeilla.....	41
5.2.2 Mittaukset toisen erän elektrodeilla	41
5.3 Pinnoitteen paksuuden tutkiminen	42
6 Tulokset.....	44
6.1 Pinnoitteen paksuus.....	44
6.1.1 Ensimmäisen erän pinnoitteet	44
6.1.2 Toisen erän pinnoitteet.....	46
6.2 Mittaukset syklisellä voltammetrialla	49
6.3 Tutkimustulosten tarkastelu	59
7 Yhteenveto	61

8	Lähteet.....	62
	Liitteet	75

Termistö ja lyhenteet

AA	askorbiinihappo
Amiini	yhdiste jonka voi ajatella muodostuneen ammoniakista (NH_3) siten, että yksi tai useampi vetyatomi on korvautunut hiilivetyryhmällä
Aminohappo	mm. proteiinien rakennneosina esiintyviä orgaanisia molekyylejä, joissa on sekä aminoryhmä $-\text{NH}_2$ että karboksyyliiryhmä $-\text{COOH}$
Anioni	negatiivinen ioni
Anodi	positiivinen elektrodi
Askorbaatti	askorbiinihappo
DA	dopamiini
Dekarboksylaatio	hiilidioksidin lohkaiseminen aminohapoista bakteerien vaikutuksesta niin että syntyy amiini; karboksyyliiryhmän poistaminen
DI-vesi	deionisoitu vesi
DPV	differentiaalipulssi-voltammetria
Eksitoida	aktivoida, kiihdyttää
Entsyymi	biokatalyytti, biokatalysaattori; elävien solujen valmistamia valkuaisaineita, jotka nopeuttavat (katalysoivat) kullekin ominaista biokemiallista reaktiota
Etuaivojen pohja	Hypotalamukseen nähden etuaivojen edempi ja selänpuoleinen alue. Sisältää soluryhmiä jotka säätelevät vireyttä, ja toisia soluryhmiä jotka säätelevät unta. Saa syötettä hypotalamukselta ja tyvitumakkeilta, lähettää aksoneja aivokuorelle.
GABA	gamma-aminovoihappo (engl. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GluDh	glutamaattidehydrogenaasi
GluOx	glutamaattioksidaasi
Glutamaatti	glutamiinihapon anioni
Hypotalamus	sijaitsee väliaivojen pohjaosassa talamuksen alapuolella, osa hormonaalista säätelyjärjestelmää
Häntätumake	tyvitumake, joka sijaitsee lähellä aivojen keskiosaa (engl. <i>caudate nucleus</i>)
H_2O_2	vetyperoksidi
Inhiboida	estää
Invasiivinen	tunkeutuva
In vitro	koeputkessa, eliön ulkopuolella
In vivo	elävässä organismissa
Kationi	positiivinen ioni
Katodi	negatiivinen elektrodi
Kolinerginen solu	asetyylikoliinia erittävä tai sen välityksellä stimuloitua solu
Mustatumake	sijaitsee aivojen tyvessä, osa aivojen liikkeiden säätelyjärjestelmää (engl. <i>substantia nigra</i>)
Neuroni	hermosolu

NMDA-reseptori	N-metyyli-D-asparagiinihappo -reseptori, yksi glutamaatin reseptorityypeistä
PBS-liuos	fosfaatti-puskuroitu suolaliuos (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
Redox-mediaattori	elektrodiin kiinnitettävä polymeeri, joka auttaa elektroninsiirrossa elektrodin ja hapettumis-pelkistymis -entsyymin välillä
SEM	pyyhkäisyelektronimikroskooppi (engl. <i>scanning electron microscope</i>)
SV	Syklinen voltammetria, yksi sähkökemiallisista mittausten menetelmistä
Synteesi	yhdistelmä, yhdistäminen
Talamus	väliaivojen parillinen osa, jonka tumakkeiden hermosolut toimivat mm. useimpien keskushermoston aistiratojen välitasemina
Uraatti	virtsaehapon suola

Symbolit

Ω	ohmi, impedanssin yksikkö
M	molaarinen pitoisuus, mol/l

1 Johdanto

Lääketieteen jatkuvan kehittymisen ansiosta monia sairauksia ja vaivoja voidaan hoitaa tehokkaasti nykyään. On kuitenkin olemassa myös sairauksia, joille ei vielä ole olemassa hyvää hoitomuotoa. Tällaisia ovat esimerkiksi neurologiset eli hermostoon liittyvät sairaudet. Vaikka niiden oireita tunnetaankin, niiden syntyperä ja oireita aiheuttavat tekijät eivät ole täysin selvillä. Tiedetään kuitenkin, että näiden sairauksien taustalla voi olla hermosolujen tai -ratojen tuhoutumista, kuten Parkinsonin taudissa tai Alzheimerin taudissa, tai hermosolujen toimintahäiriöitä, kuten epilepsiassa, halvauksessa, masennuksessa ja skitsofreniassa.

Hermoston tuhoutumiseen liittyvää **Parkinsonin tautia** sairastaa noin 6,3 miljoonaa ihmistä maailmassa. Vielä yleisempi hermoston tuhoutumiseen liittyvä tauti on **Alzheimerin tauti**, jota sairastaa noin 26,6 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti. Kummatkin sairaudet ovat hitaasti eteneviä, mutta Parkinsonin tauti aiheuttaa liikehäiriöitä ja Alzheimer dementiaa. Parkinsonin taudissa keskiaivojen mustatumakkeen hermosolut tuhoutuvat vähitellen, ja Alzheimerin-potilaiden aivoista on löydetty vaurioituneita hermoratoja ja aivosoluja. Syytä näille tuhoutumisille ei kuitenkaan tiedetä. (Brookmeyer et al. 2007, Duodecim 2010, EPDA 2011)

Hermosolujen toimintahäiriöihin liittyvää **epilepsiaa** puolestaan sairastaa noin 50 miljoonaa, **masennusta** 121 miljoonaa ja **skitsofreniaa** 24 miljoonaa ihmistä maailmassa. Epilepsian ja masennuksen tiedetään johtuvan aivojen toimintahäiriöistä, mutta useimmissa tapauksissa syytä häiriölle ei tunneta. Skitsofreniaan sairastuneista puolestaan osalla on huomattu muutoksia aivojen rakenteessa ja toiminnassa. **Halvauksessa** hermojen toiminta häiriintyy tai loppuu kokonaan jossakin osassa kehoa. Vuosittain halvaukseen kuolee 5,5 miljoonaa ihmistä maailmassa, ja esimerkiksi aivohalvaukseen sairastuu vuosittain jopa 14 000 henkeä Suomessa. (Duodecim 2010, WHO 2004, WHO 2011)

Näille sairauksille on tällä hetkellä olemassa vain oireita lieventäviä hoitomuotoja. Parempia hoitomuotoja voidaan kehittää, jos hoidon vaikutuksia hermoston toimintaan voidaan mitata. Keskushermostoon kuuluvissa aivoissa suurin osa hermosolujen keskinäisestä viestinvälityksestä tapahtuu kemiallisesti välittäjäaineiden avulla. Selvittämällä välittäjäaineiden pitoisuuksien muutoksia aivoissa, voidaan ymmärtää paremmin yksittäisen aineen vähäisen tai liiallisen pitoisuuden vaikutukset sairauteen ja sen oireisiin. Tämän avulla voidaan ymmärtää sairauden syy-seuraussuhteita ja kehittää parempia ja tarkempia hoitomuotoja.

Välittäjäaineiden pitoisuuksien mittaaminen on kuitenkin haasteellista johtuen niiden pienistä pitoisuuksista ja fysiologisesta mittausympäristöstä aivoissa. Jotta välittäjäainekonsentraatioita voidaan mitata selektiivisesti ja tarkasti, on seuraavat asiat otettava huomioon. Mittaustekniikan on oltava vasteajaltaan nopea, sillä konsentraatiot saattavat muuttua alle sekunnissa (Robinson et al. 2008). Mittausanturina toimivan elektrodin on oltava mahdollisimman pieni kooltaan, jotta pystytään mittaamaan vain halutulta alueelta. Pienikokoinen elektrodi myös muuttaa aivojen rakennetta

mahdollisimman vähän. Elektrodin on oltava myös bioyhteensopiva, jotta mittauksesta ei aiheudu vaurioita potilaalle tai elektrodille. Lisäksi elektrodin on oltava selektiivinen mitattavalle aineelle.

Tämä diplomityö liittyy Aalto-yliopiston Sähkötekniikan korkeakoulun Elektroniikan laitoksen Elektroniikan integrointi ja luotettavuus -yksikön neurostimulointihankkeeseen, jossa tavoitteena on kehittää uusia hoitomuotoja neurologisille sairauksille. Hoitomuotojen kehittämiseksi on saatava ensin lisää tietoa neurologisten sairauksien synty- ja kehittymismekanismeista. Tämän työn luvussa 2 kerrotaan mitä välittäjäaineet ovat ja esitellään niistä tämän työn kannalta merkittävimmät. Lisäksi esitellään niiden ja neurologisten sairauksien tutkimuksissa osoitettuja yhteyksiä. Luvussa 3 esitellään sähkökemiallisia mittaussmenetelmiä, jotka soveltuvat välittäjäaineiden pitoisuuksien mittaamiseen. Tämän jälkeen esitellään vaatimukset, joita sähkökemiallisten mittaussmenetelmien käyttö aiheuttaa mitattavalle aineelle. Välittäjäaineiden havainnointiin vaikuttavat häiriötekijät esitellään myös. Luvussa 4 käydään läpi sähkökemiallisten mittaussmenetelmien elektrodivaatimukset ja tutkittuja elektrodiratkaisuja välittäjäaineiden mittaamiseen. Erityisesti keskitytään esittelemään elektrodin ainekohtaiseen selektiivisyyteen vaikuttavia pinnoitteita, sillä selektiivisyys on elektrodien suurin haaste tällä hetkellä. Pinnoitteilla voidaan lisätä anturin selektiivisyyttä, jota elektrodin pohjamateriaalilla ei saavuteta.

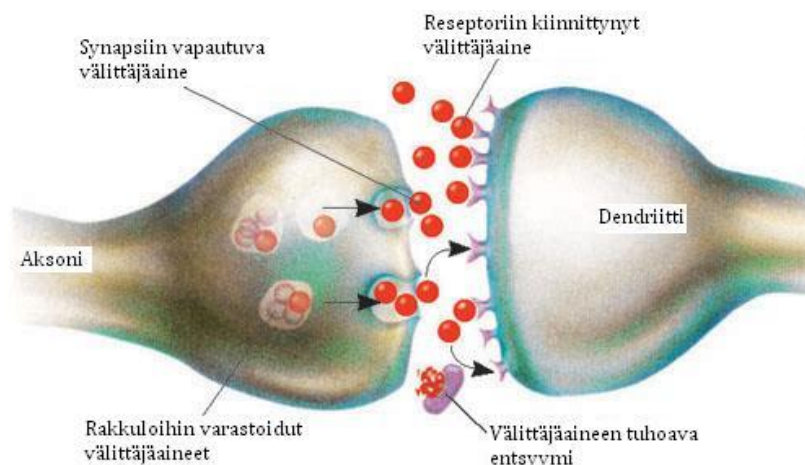
Tämän diplomityön tavoitteena on tutkia auttaako Nafion-pinnoite mittaamaan paremmin haluttua ainetta ja estämään häiriöaineen vaikutusta mittaukseen verrattuna pinnoittamattomaan platinaelektrodiin. Työn kokeellisessa osassa (luku 5) esitellään tutkimusta varten valmistettujen elektrodien valmistus platinalangasta ja Nafion-pinnoitteesta. Syklisellä voltammetrialla erilaisissa liuoksissa tehdyt mittaukset ja elektrodien pinnoitteen paksuuden kuvaaminen esitellään myös. Elektrodin kykyä mitata halutun aineen pitoisuus ja poistaa häiriöaineen vaikutus mittaukseen testattiin, ja saatuja tuloksia verrattiin pinnoittamattomalla platinaelektrodilla tehtyihin vastaaviin mittauksiin.

2 Hermoston välittäjäaineet

Hermovälittäjäaineet ovat kemiallisia aineita, joilla hermosolut kommunikoivat muiden hermosolujen, lihassolujen ja rauhasen kanssa. Kommunikointi tapahtuu synapsien välityksellä. Synapsit voivat olla joko sähköisiä tai kemiallisia. (Guyton & Hall 1996, Tortora & Derrickson 2009)

Lähes kaikki keskushermoston, eli aivojen ja selkäytimen, viestinvälitykseen käytetyt synapsit ovat kemiallisia synapseja. Kemiallisissa synapseissa ensimmäinen hermosolu (eli neuron) erittää hermovälittäjäainetta synapsiin, ja tämä välittäjäaine liikkuu seuraavan neuronin solukalvon reseptoriproteiinille, jossa se joko eksitoi (eli aktivoi), inhiboi (eli estää) tai muuttaa jollain muulla tavalla neuronin herkkyyttä. (Guyton & Hall 1996)

Kuvassa 1 on kemiallinen synapsi. Vasemmalla kuvassa on hermosolun aksoni, joka vapauttaa hermoston välittäjäaineita, ja oikealla on vastaanottavan hermosolun dendriitti, joka ottaa välittäjäaineita vastaan. Aksonin päädyssä on rakkuloita, joissa kuvassa punaisina palloina esitetyt välittäjäaineet ovat varastoituneena. Välittäjäaineet vapautuvat rakkuloista synapsirakoon, eli aksonin ja dendriitin väliseen rakoon. Osa välittäjäaineista päätyy dendriitin reseptoreille, jotka kuvassa näkyvät vaaleina nystyröinä dendriitin päässä. Osa kuvan punaisista välittäjäaineista jää solunulkoiseen nesteeseen, eikä päädy tämän dendriitin reseptoreille. Reseptorien kautta aineet vaikuttavat seuraavaan hermosoluun.

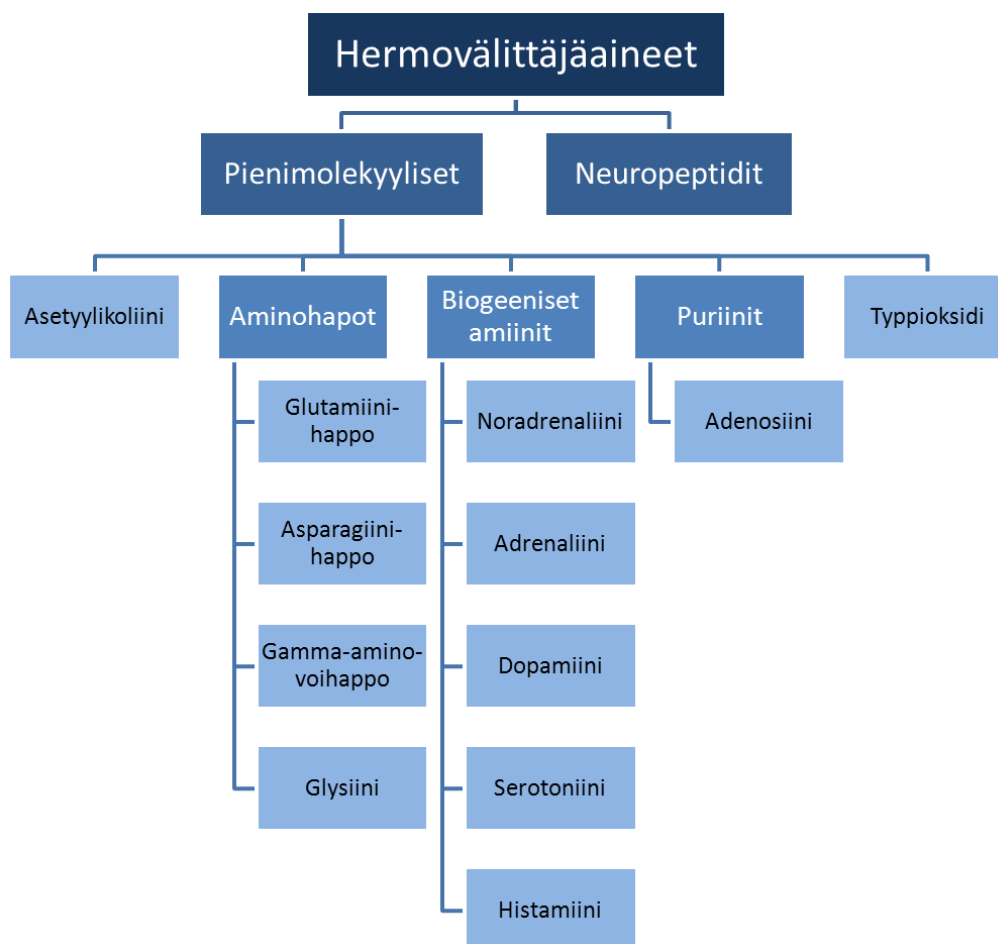


Kuva 1. Kemiallinen synapsi (muokattu lähteestä: Johnson 2008).

Aikuisen ihmisen kehon painosta noin 56 % on nesteitä, joista kaksi kolmasosaa on solunsisäistä ja yksi kolmasosa solunulkoista nestettä. Solunulkoinen neste liikkuu jatkuvasti läpi kehon, ja se sisältää solujen ylläpitoon tarvitsemat ionit ja ravintoaineet. Solunulkoisessa nesteessä on suuria määriä natriumia, kloridia ja vetykarbonaatti-ioneja, sekä solujen ravintoaineita, kuten happea, glukoosia, rasvahappoja ja aminohappoja. Lisäksi se kuljettaa hiilidioksidia ja muita solutuotteita. (Guyton & Hall 1996) Aivojen sähkökemiallisissa mittauksissa ollaan kiinnostuneita nimenomaan

solunulkoisen nesteen välittäjäainekonsentraatioista, koska siellä välittäjäaineet kulkeutuvat hermosolusta toiseen.

Ihmiselimestöstä on tunnistettu yli 40 eri välittäjäainetta. Ne voidaan jakaa kahteen luokkaan niiden koon perusteella: pienimolekyyliset herm välittäjäaineet ja neuropeptidit. (Guyton & Hall 1996, Tortora & Derrickson 2009) Kuvassa 2 on esitetty solunulkoisen nesteen merkittävimpien herm välittäjäaineiden jako alaryhmiin.



Kuva 2. Hermovälittäjäaineet.

Pienimolekyyliset välittäjäaineet ovat nopeasti toimivia, ja ne aikaansaavat suurimman osan hermoston akuuteista vasteista, kuten aistisignaalien välityksen aivoihin ja motorisen signaalin palauttamisen lihaksiin. Kun aktiopotentiaali, eli hermoimpulssi saapuu presynaptiseen (eli synapsia edeltävään) terminaaliin rakkulat vapauttavat omaa välittäjäainettaan synapsirakoon. Tämä kaikki tapahtuu alle millisekunnissa. Pienimolekyylinen välittäjäaine saapuu postsynaptisen (eli synapsin jälkeisen) kalvon reseptorille myös alle millisekunnissa. Neuropeptidit puolestaan aikaansaavat yleensä hitaita ja pitkäkestoisia toimintoja, kuten pitkäaikaiset muutokset reseptorien määrässä tai tiettyjen ionikanavien pitkäaikaiset avaamiset tai sulkemiset. Lähes poikkeuksetta tiettyntyyppinen hermosolu vapauttaa vain yhtä pienimolekyylistä välittäjäainetta, mutta sen lisäksi se voi erittää myös yhtä tai useampaa neuropeptidiä. (Guyton & Hall 1996, Tortora & Derrickson 2009)

Osa aminohapoista toimii keskushermostossa välittäjäaineina. Näihin kuuluvat glutamiinihappo, asparagiinihappo, gamma-aminovoihappo ja glysiini. Glutamiinihappo ja asparagiinihappo ovat voimakkaasti eksitoivia välittäjäaineita. Gamma-aminovoihappo ja glysiini puolestaan ovat tärkeitä inhiboivia välittäjäaineita. (Tortora & Derrickson 2009)

Osa elimistön aminohapoista muokkaantuu ja dekarboksyloituu muodostaen biogeenisiä amiineja. Hermostossa yleisiä biogeenisiä amiineja ovat noradrenaliini, adrenaliini, dopamiini, serotoniini ja histamiini. Noradrenaliini, adrenaliini ja dopamiini kuuluvat katekoliamiineihin, sillä ne kaikki sisältävät aminoryhmän $-NH_2$, kuuden hiilen muodostaman katekolirenkaan ja kaksi vierekkäistä hydroksyyli ryhmää $-OH$. Biogeeniset amiinit voivat sekä eksitoida että inhiboida. Toimintatapa riippuu synapsin reseptorityypistä. (Purves et al. 2001, Robinson et al. 2008, Tortora & Derrickson 2009)

Puriineihin kuuluvat adenosini ja sen johdannaiset ovat eksitoivia välittäjäaineita sekä keskus- että ääreishermostossa (Tortora & Derrickson 2009). Adenosini aiheuttaa verisuonten laajentumista, eli auttaa säätelemään paikallista veren virtausta (Guyton & Hall 1996). Adosiniinilla ja sen johdannaisilla on monia tärkeitä tehtäviä elimistössä, kuten niiden rooli DNA:n ja RNA:n rakenneosina. (Knox et al. 2011)

Tässä työssä keskitytään tarkemmin vain osaan näistä välittäjäaineista. Käsiteltäviksi on valittu ne aineet, jotka tutkimusten perusteella vaikuttavat useaan sairauteen. Näitä ovat asetyylikoliini, glutamiinihappo, gamma-aminovoihappo, dopamiini, noradrenaliini ja serotoniini. Kappaleessa 3.2 käsitellään näiden aineiden ominaisuuksia. Kappaleessa 3.3 esitellään kaksi muuta solunulkoisen nesteen ainetta, joilla on haittavaikutuksia hermovälittäjäaineiden mittauksiin.

2.1 Tärkeimmät välittäjäaineet

2.1.1 Asetyylikoliini

Hermoston tutkituin välittäjäaine on asetyylikoliini. Sitä tuottavat monet ääreishermoston hermosolut ja osa keskushermoston hermosoluista. Sitä erittyy hermosoluista useissa aivojen alueissa. Riippuen synapsista asetyylikoliini voi toimia eksitoivana tai inhiboivana välittäjäaineena. Asetyylikoliini muodostuu presynaptisessa, eli ennen synapsia sijaitsevassa terminaalissa asetyylikoentsyymi A:sta ja koliinista koliiniasetyyylitransferaasi-entsyymillä läsnä ollessa. Sieltä se kulkeutuu rakkuloihin. Vapautuessaan synapsirakoon asetyylikoliini pilkkoutuu asetaatiksi ja koliiniksi asetyylikoliiniesteraasi-entsyymillä avulla. (Guyton & Hall 1996, Tortora & Derrickson 2009)

Asetyylikoliini vaikuttaa moniin eri elimistön toimintoihin: se laajentaa verisuonia, hidastaa sydämen sykettä, vähentää sydämen supistusvoimaa, voimistaa ruoansulatuselimistön supistuksia ja pienentää virtsarakon tilavuutta. Asetyylikoliini on tärkeä välittäjäaine muistin ja oppimisen kannalta. Se säätelee osittain myös vireyttä ja tarkkaavaisuutta. Alzheimerin tautia sairastavilla sen määrä aivoissa on huomattavasti pienempi kuin normaalisti. (Encyclopædia Britannica 2011, Purves et al. 2001)

Alzheimerin tautiin liittyy asetyylikoliinia vapauttavien hermosolujen tuhoutuminen (Coyle et al. 1983) ja Parkinsonin tautiin puolestaan asetyylikoliinin liiallinen konsentraatio (Tortora & Derrickson 2009). Asetyylikoliinia esiintyy solunulkoisessa nesteessä normaalisti noin 0,026 - 0,044 μM (Jia et al. 2004).

2.1.2 Glutamiinihappo

Glutamiinihappoa, eli anioni-nimeltään glutamaattia, erittyy presynaptisissa terminaaleissa monissa aistiradoissa, kuten myös monissa aivokuoren alueissa. Suurin osa keskushermoston eksitoitavista hermosoluista ja noin puolet aivojen synapseista välittää tietoa glutamaatin avulla. Sen toiminta-aika on vain muutamia millisekunteja. (Guyton & Hall 1996, Tortora & Derrickson 2009) Glutamaatti on myös GABA:n synteesin esiaste (Knox et al. 2011).

Glutamaatin arvellaan liittyvän kognitiivisiin toimintoihin aivoissa, kuten oppimiseen ja muistiin (Knox et al. 2011). Glutamaatti on liitetty skitsofreniaan, Parkinsonin tautiin, epilepsiaan ja halvaukseen (Kulagina et al. 1999). Liian suuri määrä glutamaattia saattaa puolestaan aiheuttaa hermostollista vahinkoa, joka on liitetty esimerkiksi Amyotrofiseen lateraaliskleroosiin ja Alzheimerin tautiin (Knox et al. 2011). Glutamaatin konsentraatio solunulkoisessa nesteessä on noin 4 - 350 μM (Chakraborty & Raj 2007).

2.1.3 Gamma-aminovoihappo

Gamma-aminovoihappoa eli GABA:a löytyy vain keskushermostosta, ja sitä erittyy selkäytimessä, pikkuaivoissa (engl. *cerebellum*), tyvitumakkeessa (engl. *basal ganglia*) ja monilla aivokuoren alueilla. Kolmasosa aivojen synapseista käyttää GABA:a, ja se onkin keskushermoston yleisin inhiboiva välittäjäaine. (Guyton & Hall 1996, Tortora & Derrickson 2009) GABA:a esiintyy paljon hypotalamuksessa, joka ohjailee autonomisia toimintoja, kuten unta, kehon lämpötilaa ja aivolisäkkeen aktiivisuutta (A4M 2005). GABA on liitetty epilepsiaan (Treiman 2001). Sen konsentraatiosta ei ole tarkkaa tietoa, mutta eri selvitysten mukaan konsentraatiot vaihtelevat 0,080 - 0,450 μM välillä (Naini et al. 1993, Nisijima et al. 1995).

2.1.4 Dopamiini

Yleensä dopamiini toimii inhiboivana välittäjäaineena. Sitä erittyy keskiaivojen mustatumakkeesta (engl. *substantia nigra*). (Guyton & Hall 1996) Dopamiini liittyy emotionaalisiin vasteisiin, addiktoivaan käyttäytymiseen ja miellyttäviin kokemuksiin. Lisäksi dopamiinia erittävät hermosolut auttavat säätelemään luustolihasen kuntoa ja joitakin liikkeitä. (Tortora & Derrickson 2009) Se on tyrosiinin johdannainen ja noradrenaliinin ja adrenaliinin esiaste. (Knox et al. 2011) Dopamiinia esiintyy solunulkoisessa nesteessä vain 0.001-0.05 μM (O'Neill 1994).

Dopamiinin on todettu liittyvän Parkinsonin tautiin, skitsofreniaan ja masennukseen (Lotharius & Brundin 2002, Breier et al. 1997, Ruhé et al. 2007). 1960-luvulla huomattiin, että Parkinsonin taudista kärsivillä on lähes täydellinen dopamiinikato häntätumakkeen (engl. *caudate nucleus*) alueella (Wightman et al. 1988). Lisäksi yksi skitsofrenian muoto liittyy liialliseen dopamiinin kertymiseen. (Guyton & Hall 1996, Tortora & Derrickson 2009)

2.1.5 Noradrenaliini

Noradrenaliinia erittävät monet aivorungossa ja hypotalamuksessa sijaitsevat hermosolut. Noradrenaliini vaikuttaa heräämiseen, uneen ja mielialan säätöön. Se toimii myös hormonina. Noradrenaliini auttaa säätelemään mielen aktiivisuutta ja mielialaa, esimerkiksi kasvattaen vireystilaa ja tarkkaavaisuutta. (Guyton & Hall 1996, Purves et al. 2001, Tortora & Derrickson 2009) Noradrenaliinia esiintyy solunulkoisessa nesteessä vain 0.001 - 0.05 μM , eli yhtä vähän kuin dopamiinia (O'Neill 1994). Noradrenaliinin, serotoniinin ja dopamiinin epätasapainolla aivoissa on todettu olevan vaikutusta masennukseen (Ruhé et al. 2007, Tortora & Derrickson 2009). Erityisesti noradrenaliinin ja serotoniinin vähentynyt konsentraatio on liitetty masennukseen. (Guyton & Hall 1996)

2.1.6 Serotoniini

Serotoniinia erittyy aivorungossa, ja se toimii inhibiittorina kipuradoissa selkäytimessä (Guyton & Hall 1996). Serotoniini on keskittynyt aivoissa Raphe-tumakkeen hermosoluihin. Serotoniini vaikuttaa aistituntemuksiin, lämpötilan säätelyyn, mielialan kontrollointiin, ruokahuuun ja nukahtamiseen. (Tortora & Derrickson 2009) Serotoniinia esiintyy solunulkoisessa nesteessä vain 0.001-0.01 μM (O'Neill 1994).

2.2 Välittäjäaineiden vaikutukset sairauksiin

Useimmat välittäjäaineet on eri tutkimuksissa liitetty erinäisiin sairauksiin, mutta välittäjäaineiden vähentyneen tai kasvaneen konsentraation ja sairauden syy-seuraussuhteet ovat useimmissa tapauksissa epäselviä. Lisäksi samaan sairauteen on liitetty useiden eri välittäjäaineiden epänormaalit konsentraatiot, mutta kuitenkin ei tiedetä eri välittäjäaineiden konsentraatioiden välisiä syy-seuraussuhteita. Tässä työssä on valittu käsiteltäväksi vain asetyylikoliinin, glutamaatin, dopamiinin, GABA:n, noradrenaliinin ja serotoniinin vaikutukset sairauksiin. Nämä välittäjäaineet valittiin, koska ne ovat tutkimusten perusteella merkittävimpiä vaikuttajia neurologisiin sairauksiin. Taulukkoon 1 on kerätty tärkeimmät oletukset välittäjäaineiden ja sairauksien yhteyksistä. Taulukosta nähdään, että glutamaatti ja dopamiini ovat merkittäviä usean yleisen sairauden kannalta.

Taulukko 1. Eri sairauksiin liitetyt hermovälittäjäaineet.

	Parkinsonin tauti	Alzheimerin tauti	Epilepsia	Halvaus	Masennus	Skitsofrenia
Asetyylikoliini	X	X				
Glutamaatti	X		X	X		X
GABA			X			
Dopamiini	X				X	X
Noradrenaliini					X	
Serotoniini					X	

Parkinsonin tauti on hitaasti etenevä liikehäiriösairaus, joka johtuu keskiaivojen mustatumakkeen *pars compacta* -osan hermosolujen vähittäisestä ja laajasta tuhoutumisesta. Hermosolujen vaurioitumisen syytä ei tiedetä, mutta koska tämä alue

lähettää dopamiinia erittäviä hermokuituja, tiedetään että se johtaa hermovälittäjäaine dopamiinin puutteeseen. Lihasjäykkyys aiheutuu nimenomaan dopamiinia erittävien hermosolujen rappeutumisesta. (Guyton & Hall 1996, Duodecim 2010, Tortora & Derrickson 2009) Taudin oireiden uskotaan johtuvan dopamiinin ja asetyylikoliinin konsentraatioiden epätasapainosta: liian vähän dopamiinia ja liikaa asetyylikoliinia. Taudin hoidossa yritetäänkin lisätä dopamiinin konsentraatiota ja vähentää asetyylikoliinin tuotantoa. Syväaivostimulaatiota (engl. *deep-brain stimulation*, DBS) on käytetty Parkinsonin taudin oireiden lievittämiseen. Menetelmä perustuu subtalaamisen tumakkeen (engl. *subthalamic nucleus*) stimuloimiseen sähkövirralla. Stimuloinnin tiedetään vapauttavan glutamaattia ja sitä kautta auttavan oireisiin. Glutamaan liiallisen esiintymisen tiedetään kuitenkin myös tuhoavan hermosoluja. Tästä johtuen glutamaan ja Parkinsonin taudin yhteys ei ole täysin selvillä vielä. Tämän selvittämiseksi tarvitaan mikroantureita, joilla on paranneltu spatiaalinen ja ajallinen resoluutio. (Covey & Garris 2009, Kincses & Vecsei 2010, Lee et al. 2007, Tortora & Derrickson 2009)

Alzheimerin tauti on aivoja rappeuttava etenevä muistisairaus, joka aiheuttaa dementiaa. Taudin perimmäistä syytä ei tiedetä, mutta sairastuneen aivoissa on havaittavissa muutoksia, jotka vaurioittavat hermoratoja ja aivosoluja. Vauriot alkavat ohimolohkojen sisäosista ja leviävät ajan myötä laajemmin aivokuorelle. Alzheimerin tautiin liittyy neuropatologisia ominaisuuksia, kuten aivojen surkastumista, amyloidiplakkeja ja hermosyvyvyhtejä. Kuitenkin plakkeja ja vyyhtejä esiintyy pienissä määrin myös ikääntyneissä aivoissa henkilöillä, joille ei ole diagnosoitu dementiaa. (Duodecim 2010, Muir 1997)

Alzheimer-potilaalla esiintyy hermosolujen katoa. Erityisesti asetyylikoliinia käyttävät hermosolut tuhoutuvat. Hermoratojen tuhoutuminen vaikuttaa myös serotoniinia, noradrenaliinia ja dopamiinia välittäviin hermosoluihin. Tärkeä löydös oli, kun huomattiin, että koliiniasetyylitransferaasin (biokemiallinen markkeri kolinergisille neuroneille) aktiivisuus on vähentynyt Alzheimer-potilailla. Myös kolinergisten hermosolujen menetystä esiintyy Meynertin tyvitumake -alueella etuaivojen pohjassa, jossa on kolinergisiä hermosoluja. Dementian hypoteesi onkin kolinergisten systeemien heikentyminen etuaivojen pohjassa. (Duodecim 2010, Muir 1997)

Epilepsia on aivojen sähköisen toiminnan häiriötila. Epilepsiakohtaus syntyy, kun aivojen hermosolut purkautuvat liiallisesti. Tämä hermosoluryhmien ominaisuus tuottaa näitä purkauksia liittyy todennäköisesti ehkäisevien GABAergisten ja kiihdyttävien glutamatergisten mekanismien vuorovaikutukseen. Erityisesti sen uskotaan liittyvän niihin mekanismeihin, joihin liittyy glutamaan N-metyyli-D-asparagiinihappo (NMDA) -reseptorityypit. Epilepsia on siis oire jostakin aivoihin vaikuttavasta sairaudesta tai häiriöstä. Useimmissa tapauksissa syytä epilepsiaan johtavaan aivotoimintahäiriöön ei kuitenkaan tiedetä. (Bradford 1995, Duodecim 2010).

Halvaus syntyy, kun jokin hermotoiminta lamaantuu. Tämä johtuu hermojen toiminnan häiriintymisestä tai loppumisesta kokonaan jossakin osassa kehoa. Useimmiten häiriö tapahtuu aivoissa tai selkäytimessä. (Duodecim 2010) Plasman korkeilla

glutamaattikonsentraatioilla on huomattu olevan yhteys halvauksen kasvuun akuutissa aivoverenkiertohäiriössä. (Castellanos et al. 2008)

Masennukset johtuvat usein aivojen toimintahäiriöistä (Duodecim 2010). Masennuksen yleisimmät oireet ovat alakuloinen mieliala, vähentynyt kyky saada nautintoa normaaleista lähteistä, ärtyisyys, keskittymisvaikeudet ja epänormaali ruokahalu ja unentarve. Masennuksen syytä ei tunneta. On kuitenkin todettu, että lääkkeitä, jotka parantavat serotoniinin ja noradrenaliinin erittymistä auttavat masennuksen oireisiin. (Krishnan & Nestler 2008) Dopamiinilla on myös huomattu olevan vaikutusta masennukseen. Sen puutteen on havaittu vaikuttavan masennukseen, mutta hypoteesin vahvistamiseksi tarvitaan vielä paljon lisää tietoa dopamiinin konsentraation tarkoista vaikutuksista. (Dailly et al. 2004)

Skitsofreniaa sairastavista osalla on huomattu muutoksia aivojen rakenteessa ja toiminnassa (Duodecim 2010). Glutamaattia tuottavat hermosolut ovat merkittävimmät eksitoivat polut aivokuoren, limbisen järjestelmän ja talamuksen välillä. Nämä alueet on myös liitetty skitsofreniaan. Skitsofrenia-potilaiden kuoleman jälkeiset tutkimukset ovat paljastaneet muutoksia muutamilla aivoalueilla pre- ja postsynaptisissa markkereissa glutamatergisille neuroneille. Glutamaatin NMDA-reseptori on erityisen kiinnostava, sillä tämän reseptorin tukkiminen terveillä henkilöillä tuottaa skitsofrenian tyypillisiä oireita, negatiivisia oireita ja kognitiivisia häiriöitä, sekä lisää dopamiinin eritystä mesolimbisessä järjestelmässä. Aineet, jotka epäsuorasti parantavat NMDA-reseptorin toimintaa vähentävät negatiivisia oireita ja vaihtelevasti parantavat kognitiivisia toimintoja skitsofrenia-potilaissa. (Goff & Coyle 2001)

3 Välittäjäaineiden mittaus

Aivojen välittäjäaineiden mittaamiseen on yleisesti käytössä kolme erilaista tekniikkaa: mikrodialyysi, spektroskooppiset menetelmät ja sähkökemialliset menetelmät. Mikrodialyysi on invasiivinen ja sillä saadaan erittäin hyvä kemiallinen resoluutio. Se on myös laajimmin käytössä oleva näistä menetelmistä, mutta se ei sovellu tutkimuksiin, joissa tarvitaan nopeaa näytteenottoa. Spektroskooppiset menetelmät eivät ole invasiivisia, ja niiden avulla saadaan avaruudellisesti eroteltuja kuvia aivojen hermoston aktiivisuudesta. Kaksi vallitsevaa spektroskopia-menetelmää ovat funktionaalinen magneettikuvantaminen (engl. *functional Magnetic Resonance Imaging*, fMRI) ja positroniemissiotomografia (engl. *Positron Emission Tomography*, PET). Näiden haittapuolena kuitenkin on fMRI:n tapauksessa lääkeaineiden käyttö tietyn halutun välittäjäaineen aktivoimiseksi ja PET:n tapauksessa kemiallisten positroneja emittoivien aineiden käyttö reseptorien aktivoimiseksi tai inhiboimiseksi. (Robinson et al. 2008) Sähkökemialliset menetelmät puolestaan eivät vaadi radioaktiivisten merkkiaineiden käyttöä, ja osa menetelmistä mahdollistaa myös nopean näytteenoton. Tämän vuoksi tässä työssä esitellään tarkemmin vain sähkökemiallisia menetelmiä.

Tässä luvussa esitellään ensin sähkökemialliset mittausmenetelmät, joita käytetään välittäjäaineiden mittaamiseen. Tämän jälkeen tarkastellaan mittauksen kannalta olennaisia välittäjäaineiden ominaisuuksia ja mittauksen häiriötekijöitä. Häiriöitä mittauksiin aiheuttaa lähinnä askorbiinihappo, jota esiintyy runsaasti samoilla alueilla kuin välittäjäaineita. Toinen häiriötekijä on virtsahappo, joka sekin vähäisemmällä esiintyvyydellään aiheuttaa ongelmia mittauksiin.

3.1 Sähkökemialliset mittausmenetelmät

Sähkökemiallisin menetelmin voidaan havaita aineita, jotka hapettuvat positiivisesti polarisoituneella työelektrodilla (vs. negatiivisesti polarisoitunut vastaelektrodi) liuoksessa. Hapettunut aine luovuttaa elektroneja, jotka kulkeutuvat työelektrodille ja aiheuttavat virran sen läpi. Sähkökemialliset menetelmät perustuvat tämän virran mittaamiseen. Osa biologisesti merkittävistä aineista hapettuu näissä olosuhteissa, ja siksi niitä kutsutaan sähköisesti aktiivisiksi aineiksi. (Rayne 1997)

Sähkökemiallisia menetelmiä on käytetty pitkään analyttisessä kemiassa, mutta vasta 1973 Ralph Adams kollegoineen osoitti, että on mahdollista implantoida työelektrodi rotan aivoihin ja havaita sähköisesti aktiivisia aineita *in vivo*. Tämä oli suuri läpimurto, sillä sähkökemiallisilla menetelmillä pystyttiin korvaamaan siihen asti käytetyt radioaktiivisia merkkiaineita käyttävät menetelmät. (Rayne 1997)

1970-luvulla käytettiin sähkökemiallisista menetelmistä lähinnä differentiaalipulssivoltammetriaa (engl. *Differential Pulse Voltammetry*, DPV). Sen rajoituksena oli hidas näytteenotto: 1-2 näytettä / minuutti. Vuosikymmenen vaihteessa alettiin käyttää uutta nopeasyklistä voltammetriaa (engl. *Fast Cyclic Voltammetry*, FCV tai engl. *Fast Scan*

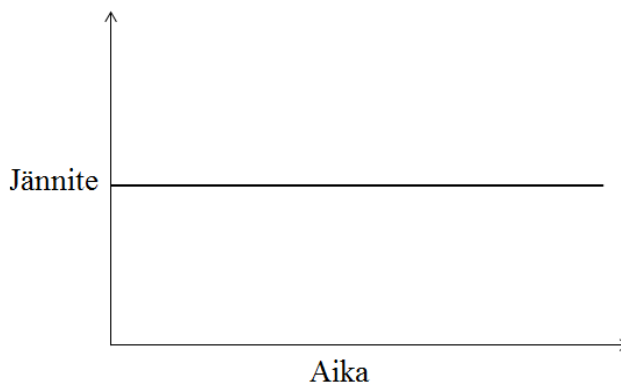
Cyclic Voltammetry, FSCV). Näytteenottoaika parani huomattavasti (16 näytettä / sekunti), ja menetelmällä pystyttiin havaitsemaan alle mikromolaarisia konsentraatioita. 1980-luvulla julkaistiin useita artikkeleita koskien nimenomaan voltammetrisia menetelmiä, eli sähkökemiallisia menetelmiä, joissa jännite syötetään elektrodille ja syntyvä virta mitataan. (Rayne 1997)

Elektrodimateriaalia valittaessa ja mittauksia suorittaessa on tärkeää ottaa huomioon aineen sähkökemiallinen ikkuna. Se on jänniteväli, jossa aine ei hapetu eikä pelkisty. Veden ikkuna on tärkeä ottaa huomioon, sillä muutoin se saattaa hapettua muodostaen happea tai pelkistyä muodostaen vetykaasua. Esimerkiksi platina ja iridiumoksidi -elektrodeille vesi-ikkuna on noin -0,6 V - 0,8 V, kun vastaelektrodina on Ag|AgCl (hopea-hopeakloridi). (Cogan 2008, Merrill et al. 2005)

Tässä kappaleessa esitellään neljä yleisintä sähkökemiallista mittausmenetelmää: amperometria, kronoamperometria, differentiaalipulssi-voltammetria ja syklinen voltammetria. Ne ovat yleisimmin käytössä olevat sähkökemialliset mittausmenetelmät välittäjäainekonsentraatioiden mittaamiseen. Sykliseen voltammetriaan perehdytään tarkemmin, sillä sitä käytetään tämän diplomityön kokeellisessa osuudessa.

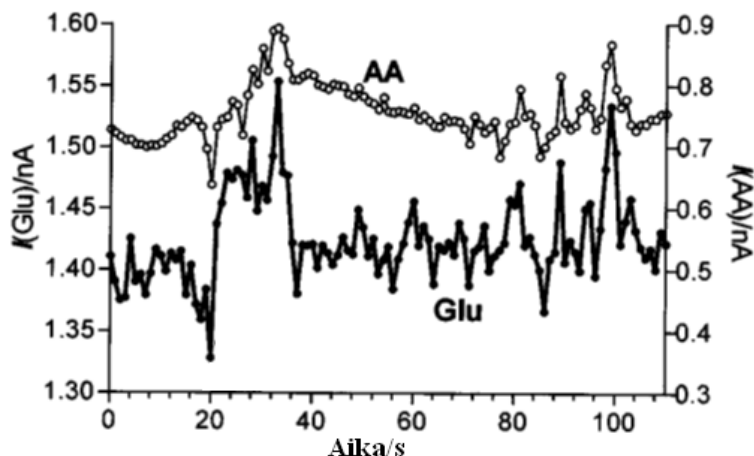
3.1.1 Amperometria

Amperometriassa käytettävä jännite pidetään samalla tasolla koko kokeen ajan. Kuva 3 esittää tätä jännitteen suhdetta aikaan. Tämä tarkoittaa, että sillä ei saada tietoa virran suhteesta jännitteeseen. Tämän vuoksi amperometria soveltuu vain tilanteisiin, joissa aineita ei tarvitse tunnistaa, vaan tiedetään mitä ainetta mitataan. (Michael & Borland 2007)



Kuva 3. Amperometriassa käytettävä tasainen jännite ajan suhteen.

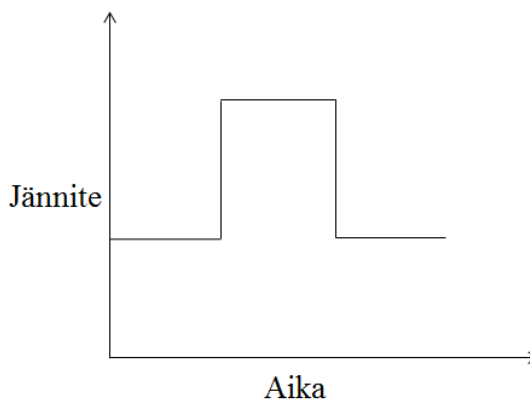
Kuvassa 4 on amperogrammi, johon on yhdistetty kahden eri mittauksen tulokset kahdesta eri aineesta. Amperometrian hyvä puoli on nopeus, jolla tietoa saadaan kerättyä. Ainoa mittausta rajoittava tekijä on virtaa mittaavan elektroniikan nopeus. Amperometriaa voidaan käyttää myös vain haluttujen aineiden tunnistamiseen suuremmasta joukosta eri molekyylejä, mutta tämä vaatii elektrodien muokkausta entsyymeillä. Nämä entsyymit auttavat mittaamaan selektiivisesti vain halutun aineen. (Michael & Borland 2007)



Kuva 4. Amperogrammi, jossa tulokset sekä askorbiinihapolle (AA) että glutamaatille (Glu) (muokattu lähteestä: Lowry et al. 1998).

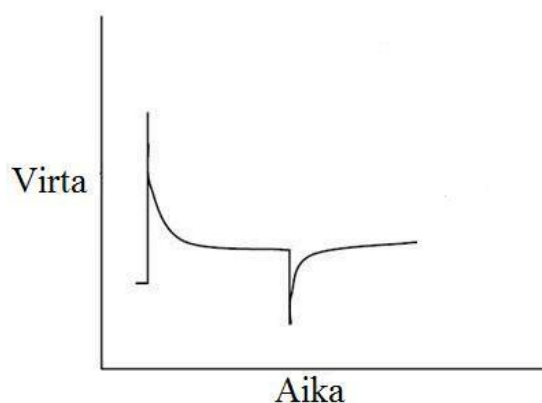
3.1.2 Kronoamperometria

Kronoamperometriassa (engl. *chronoamperometry*) jännitettä muutetaan suorakaiteenmuotoisesti. Ensin aloitetaan alkujännitteellä, joka ei riitä halutun aineen hapettamiseen tai pelkistämiseen. Jännitettä kasvatetaan äkillisesti tarpeeksi suureksi, jotta haluttu aine reagoi. Tämän jälkeen jännite palautetaan alkutasolle. Kuva 5 esittää kronoamperometriassa käytettävän jännitteen suhdetta aikaan. Alkujännitteen aikana havaittu virta on verrannollinen liuoksen sähköisesti aktiivisten aineiden konsentraatioon. Virta vaimenee käänteisesti verrannollisesti ajan neliöjuurelle, jos sitä hallitsee diffuusio. (Robinson et al. 2008, Michael & Borland 2007)



Kuva 5. Kronoamperometriassa käytettävän jännitteen suhde aikaan.

Kun suuremmasta jännitteestä palataan takaisin alkujännitteeseen, pelkistyvät ne aineet, jotka alun perin hapettuivat nostettaessa alkujännitettä suuremmaksi. Vertaamalla näiden kahden hetken mitattuja virtoja saadaan tietoa hapettuneiden aineiden vakaudesta. Tämän takia kronoamperometrialla saadaan parempi selektiivisyys kuin amperometrialla. (Robinson et al. 2008) Kuvassa 6 on esimerkki kronoamperometrialla saatavasta virrasta ajan suhteen.

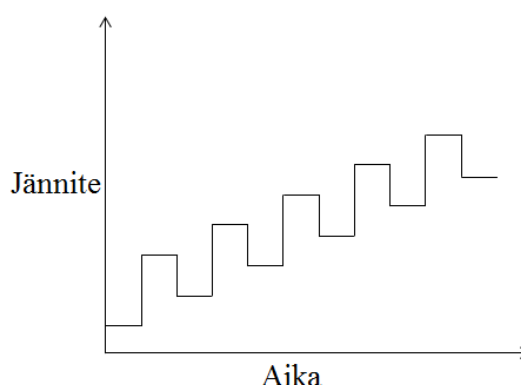


Kuva 6. Kronoamperogrammi (muokattu lähteestä: Young In, 2005).

Kronoamperometriaa on käytetty usein mittaamaan hermovälittäjäaineiden pitoisuuksia reaaliajassa aivojen solunulkoisessa nesteessä. Kuitenkin sen kemiallinen selektiivisyys on rajallinen ja siksi sitä käytetään lähinnä mittauksiin, joissa itse syötetään välittäjäainetta tai sitä välittömästi vapauttavaa ainetta. (Robinson et al. 2008)

3.1.3 Differentiaalipulssi-voltammetria

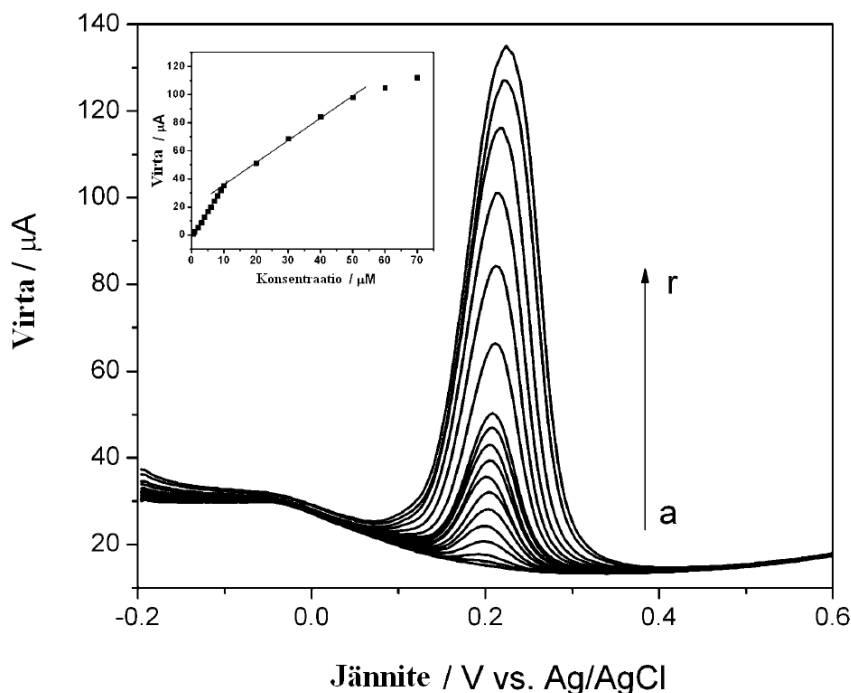
Differentiaalipulssi-voltammetriaa (DPV) on käytetty jo pitkään hermovälittäjäaineiden mittauksiin *in vivo*. Voltammetriassa työelektrodille syötetään jännitettä, jotta haluttu aine hapettuu (Covey & Garris 2009). Se on yhdistelmä lineaarinen pyyhkäisy - voltammetriaa (LSV, engl. *Linear Sweep Voltammetry*) ja neliöaalto-menetelmiä. Syötettävä signaali on pienen amplitudin neliöaalto (noin 25 mV) tasaisella taajuudella, hitaasti kasvavan lineaarijännitteen päälle asetettuna. Kuvassa 7 on esimerkki DPV:ssa syötettävästä jännitteestä. Virta mitataan aina juuri ennen seuraavan pulssin alkua ja juuri ennen pulssin loppua. Näiden virtojen erosta muodostetaan differentiaalipulssi-voltammogrammi. Toisin kuin amperometrisillä tavoilla, DPV:lla on mahdollista mitata samanaikaisesti eri aineita, jos näiden hapettumisjännitteet eroavat toisistaan vähintään 100 millivoltilla. (Michael & Borland 2007, Robinson et al. 2008)



Kuva 7. Differentiaalipulssi-voltammetriassa käytettävä jännite ajan suhteen (muokattu lähteestä: Michael & Borland 2007).

DPV:aa on käytetty *in vivo* katekoliamiinien, serotoniinin ja hapen mittaamiseen. DPV:n aikaresoluutio on kuitenkin huono, sillä yhden mittauksen tekeminen kestää 30 sekuntia. Hermovälittäjäaineiden konsentraatiot puolestaan saattavat muuttua alle

sekunnissa. (Robinson et al. 2008) Kuvassa 8 on esimerkki differentiaalipulssi-voltammogrammista.

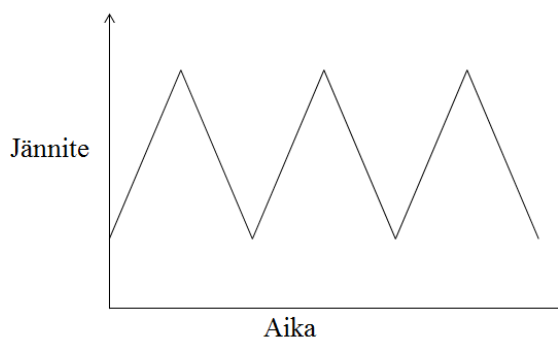


Kuva 8. Yhdistetty differentiaalipulssi-voltammogrammi useasta eri mittauksesta, jotka on tehty saman aineen eri konsentraatioille (muokattu lähteestä: Chen et al. 2010).

3.1.4 Syklinen voltammetria

Syklisellä voltammetrialla (SV) saadaan tietoa tapahtuvista sähkökemiallisista reaktioista, niiden palautettavuudesta, sähköisesti aktiivisten aineiden määrästä elektrodilla ja elektrodin stabiiliudesta. SV:n tärkein etu muihin menetelmiin verrattuna on sen suuri ajallinen resoluutio. (Cogan 2008, Michael & Borland 2007)

SV:ssa käytetään kolmea elektrodia: työelektrodia, vastaelektrodia ja referenssielektrodia. Menetelmä perustuu työelektrodin jännitteen poikkeuttamiseen syklisesti tasaisella tahdilla kahden jännitteen välillä. Kuva 9 esittää SV:ssa käytettävää jännitettä ajan suhteen. Tämä jännite toimii ajavana voimana työelektrodilla tapahtuville reaktioille, ja näiden reaktioiden aiheuttamia virtoja mitataan. Virta kulkee työelektrodin ja vastaelektrodin välillä. (Cogan 2008, Michael & Borland 2007)



Kuva 9. Syklisessä voltammetriassa käytettävä jännite ajan suhteen.

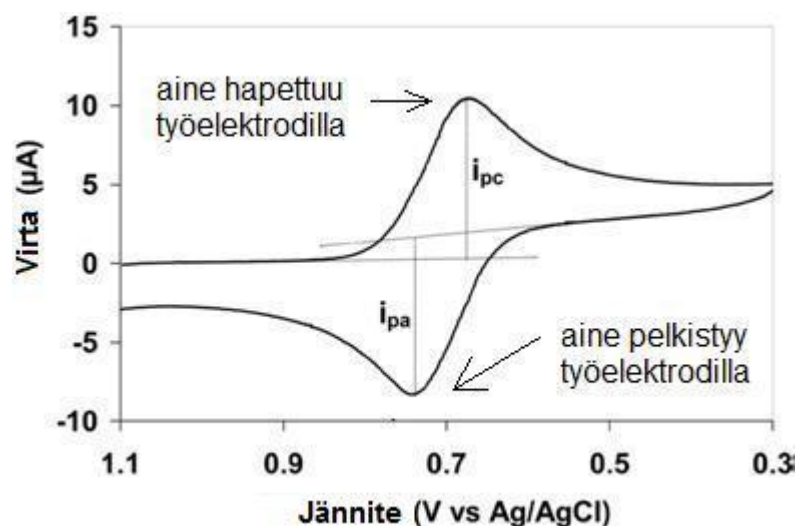
Sykliisessä voltammetriassa sähköisesti aktiiviset aineet aiheuttavat virran kasvun tietyllä hetkellä. Virtaa syntyy, kun aine hapettuu työelektrodilla ja luovuttaa elektroneja työelektrodille. Aineen hapettuminen vaatii, että kasvava positiivinen jännite ylittää aineen hapettumisjännitteen (ks. kappale 3.2.3). Tästä syntyy faradista virtaa, eli hapettumisen ja pelkistymisen aiheuttamaa virtaa (Merrill et al. 2005). Tämän faradisen virran suuruus puolestaan on verrannollinen hapettuvien aineiden konsentraatioon liuoksessa. (Rayne 1997)

Tämän jälkeen jännitteen alentaminen mahdollistaa hapettuneen aineen palautumisen, eli pelkistymisen takaisin alkuperäiseen muotoonsa negatiivisesti varautuneella työelektrodilla. Hapettuneet aineet eivät pelkistymisen ansiosta keräänny elektrodin pinnalle ja jää siihen tukkeeksi. Tämä palautumis-ominaisuus on tärkeä osa syklistä voltammetriaa ja suuri etu sen käytössä. (Rayne 1997) Jos kaikki elektrolyytissä tapahtuvat reaktiot ovat täysin palautuvia, kaksivaiheisen jännitteen syöttö ei aiheuta lopullisia muutoksia elektrodin pinnalla tai ympäröivässä kudoksessa. Palautumattomat reaktiot johtavat aineiden kerääntymiseen, joka edelleen saattaa aiheuttaa kaasukuplia, pH-arvon vaihteluita ja metalli-ionien vapautumista. Jo pienikin määrä aineiden kerääntymistä saattaa aiheuttaa suuria ongelmia ympäröivien hermosolujen toimintaan. (Loeb et al. 1995)

Syklisen voltammetrian jännite vaihtuu niin nopeasti, että vain elektrodia lähellä olevat aineet vaikuttavat mittaukseen. Kauempana olevilla aineilla ei ole aikaa liikkua elektrodille, ja näin ollen menetelmä on nopeuskontrolloitu, eikä siihen siis vaikuta aineille ominaiset diffuusionopeudet (aineen nopeus tasata konsentraatioeroja). SV sopii parhaiten nimenomaan nopeiden konsentraatiomuutosten mittaamiseen. (Michael & Borland 2007, Rayne 1997, Wightman et al. 1988)

Tästä voidaan johtaa ehto palautumis-ominaisuudelle: faradisen reaktion tulee tapahtua nopeasti verrattuna aineensiirtonopeuteen (engl. *rate of mass transport*). Ilman tarpeeksi nopeata reaktiota hapettunut aine ehtii diffundoitua kauas elektrodista, eikä se täten palaudu enää elektrodille ja pelkisty siellä. Hapettuneet aineet saattavat aiheuttaa ongelmia kudokselle, jos ne jäävät solunulkoiseen nesteeseen hapettuneessa muodossaan. (Merrill et al. 2005)

Sykliisessä voltammogrammissa kuvataan jatkuvasti mitattava virta jännitteen suhteen. Kuvassa 10 on esimerkki voltammogrammista. Voltammogrammin muoto saattaa kuitenkin vaihdella paljon, vaikka reaktiot pysyvät samoina. Käyrän muoto riippuu käytetystä pyyhkäisy nopeudesta, elektrodin geometrisestä pinta-alasta ja elektrodin epätasaisuudesta, eli karkeudesta. (Cogan 2008, Michael & Borland 2007)



Kuva 10. Syklinen voltammogrammi, jossa y-akselilla on virta (μA) ja x-akselilla jännite (V). Y-akselin positiiviset arvot ovat katodista virtaa (hapettuminen) ja negatiiviset arvot anodista virtaa (pelkistyminen). (muokattu lähteestä: Petrovic 2000)

Mitattava aine voidaan tunnistaa kvalitatiivisesti jännitteen suuruudesta. Aineen tunnistaminen on mahdollista esitetietojen avulla. Nämä esitiedot on saatu nestekromatografian ja sähkökemiallisen havaitsemisen yhdistämisellä, sillä niiden suuren herkkyyden avulla on voitu erotella ja tunnistaa aineita. Näiden tietojen avulla pystytään siis tunnistamaan syklisen voltammogrammin aineet niiden hapettumisjännitteiden avulla (ks. kappale 3.2.3). Aineen konsentraatio puolestaan on suoraan suhteellinen käyrän korkeuteen tai pinta-alaan. (Cogan 2008, Michael & Borland 2007, Wightman et al. 1988)

Voltammetrian etuja on, että elektrodin dimensiot voivat olla hyvinkin pieniä ja mittauksia voidaan suorittaa suurella ajallisella resoluutiolla. Osa välittäjäaineista hapettuu helposti, ja siksi ne voidaan tunnistaa voltammetrisilla kokeilla. Voltammetrian käytön leviämisen esteenä ovat olleet ongelmat sen selektiivisyydessä, jota kuitenkin saadaan parannettua pinnoittamalla voltammetriassa käytettäviä elektrodeja. Näistä pinnoitteista kerrotaan lisää kappaleessa 4.2. (Robinson et al. 2008)

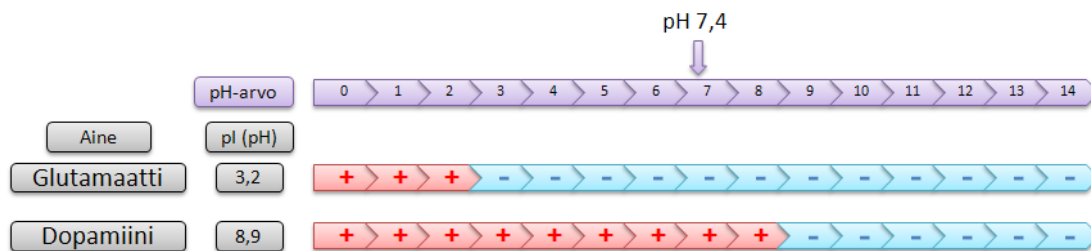
3.2 Mittaukseen vaikuttavat välittäjäaineiden ominaisuudet

Välittäjäaineilla on ominaisuuksia, joilla on merkitystä niiden konsentraatioiden mittaamiseen sähkökemiallisin menetelmin. Aineiden sähköisellä aktiivisuudella, sähköisellä varauksella ja hapettumisjännitteellä on vaikutuksensa esimerkiksi elektrodin ja elektrodipinnoitteen valinnassa. On huomioitava, että aine voi olla sähköisesti aktiivinen (ks. kappale 3.2.2) vaikka sen sähköinen kokonaisvaraus on nolla (ks. kappale 3.2.1). Se voi myös olla sähköisesti inaktiivinen vaikka sen varaus on positiivinen tai negatiivinen.

3.2.1 Välittäjäaineiden sähköinen varaus

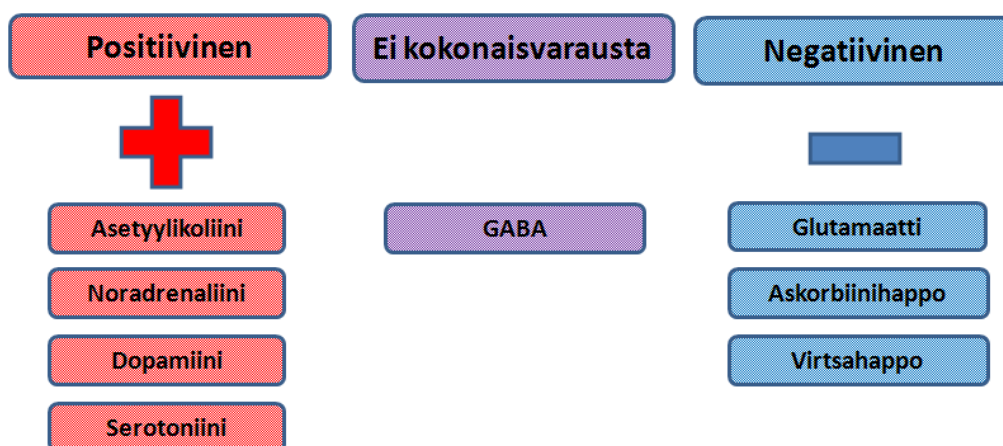
Välittäjäaineiden sähköinen kokonaisvaraus muuttuu liuoksen pH-arvon mukana. Aineilla on omat isoelektriset pisteensä, eli jokin pH-arvo, jossa niiden kokonaisvaraus

on nolla. Kuvassa 11 on esitetty glutamaatin ja dopamiinin isoelektriset pisteet (pI). Kuvasta nähdään, että pI-arvon alapuolella aineet ovat positiivisesti varautuneita, ja sen yläpuolella negatiivisesti varautuneita. (Hart et al. 2003, UBC et al. 2003)



Kuva 11. Aineiden isoelektriset pisteet. Punaiset merkit kuvaavat positiivista varausta ja siniset merkit negatiivista varausta suhteessa liilalla pohjalla esitettyihin pH-arvoihin.

Välittäjäainemittauksissa ollaan kiinnostuneita molekyylien kokonaisvarauksesta fysiologisessa pH-arvossa, joka on noin pH 7,4. Kuvasta 11 nähdään, että dopamiini on positiivisesti varautunut, kun taas glutamaatti on negatiivisesti varautunut tässä pH-arvossa. Kuvassa 12 aineet on jaoteltu niiden kokonaisvarauksen mukaan pH 7,4 -arvossa: positiivinen, negatiivinen tai ei kokonaisvarausta. Positiivisia ovat noradrenaliini, dopamiini, serotoniini (Robinson et al. 2008) ja asetyylikoliini (Wessler et al. 2001). Glutamaatti puolestaan on negatiivinen (Boxall & Tweedie 2011). Lisäksi negatiivisia ovat askorbiinihappo (May 1999) ja virtsahappo (Wright et al. 2010). GABA:n kokonaisvaraus on nolla (Gaspary et al. 1998).



Kuva 12. Molekyylien kokonaisvaraus fysiologisessa pH-arvossa.

On tärkeää tietää kunkin aineen sähköinen kokonaisvaraus, kun halutaan parantaa elektrodin selektiivisyyttä yksittäiselle aineelle. Esimerkiksi negatiivisesti varautuneella pinnoitteella voidaan karsia negatiivisesti varautuneiden aineiden vaikutusta mittausvasteeseen, ja vastaavasti parantaa positiivisesti varautuneiden aineiden mittausvastetta.

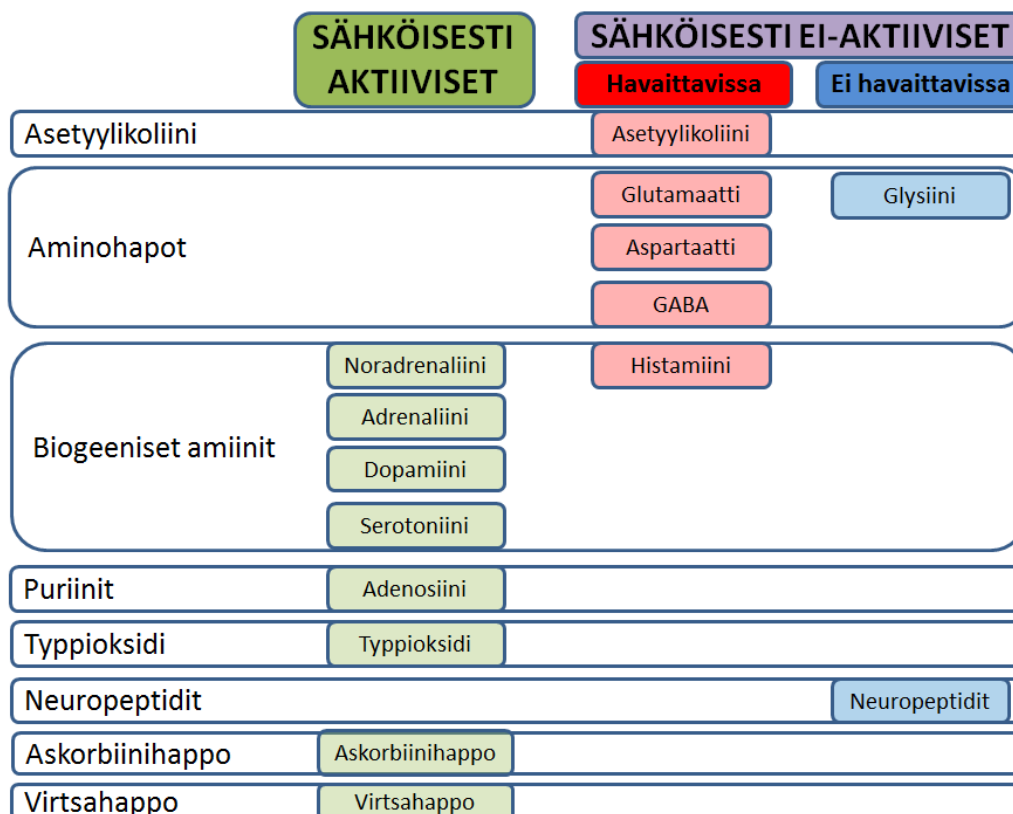
3.2.2 Välittäjäaineiden sähköinen aktiivisuus

Välittäjäaineiden sähköisen varauksen (ks. kappale 3.2.1) lisäksi ne voidaan jakaa sähköisesti aktiivisiin ja inaktiivisiin aineisiin. Aineen sähköinen aktiivisuus tarkoittaa, että se pystyy helposti luovuttamaan elektrodin (hapettuminen) ja vastaanottamaan

elektrodiin (pelkistyminen). Sähköisesti aktiiviset aineet siis hapettuvat positiivisesti polarisoituneella ja pelkistyvät negatiivisesti polarisoituneella työelektrodilla liuoksessa. Elektrodiin positiivisen jännitteen tulee olla tarpeeksi suuri, jotta hapettava aine luovuttaa elektroneja. Nämä elektronit synnyttävät sähkövirran elektrodilla, ja täten ne voidaan havaita sähkökemiallisin menetelmin (Rayne 1997, Robinson et al. 2008). Aineet voidaan jakaa kolmeen ryhmään:

1. Sähköisesti aktiivisia ja havaittavissa olevia välittäjäaineita ovat noradrenaliini, adrenaliini, dopamiini, serotoniini, adenosini ja typpioksidi (Murari et al. 2004, Rayne 1997, Robinson et al. 2008, Sun et al. 2009). Lisäksi sähköisesti aktiivisia molekyylejä solunulkoisessa nesteessä ovat askorbiinihappo ja virtsahappo (Rayne 1997).
2. Sähköisesti inaktiivisia, mutta havaittavissa olevia välittäjäaineita ovat asetyylikoliini, glutamaatti, aspartaatti, GABA ja histamiini. Niitä ei voida mitata sähkökemiallisin menetelmin pinnoittamattomalla elektrodilla (Jacobson et al. 1985, Rayne 1997, Robinson et al. 2008, Sánchez Arribas et al. 2006). Niiden havaitseminen sähkökemiallisin menetelmin on kuitenkin mahdollista, kun elektrodi pinnoitetaan erityisillä lisäaineilla, esimerkiksi oksidaasientsyymeillä. Nämä entsyymit katalysoivat tietyn aineen hapettumista tai pelkistymistä, mikä mahdollistaa aineen havaitsemisen elektrodilla. (Michael & Borland 2007)
3. Sähköisesti inaktiiviset ja havaitsemattomissa olevat glysiini ja neuropeptidit kuuluvat kolmanteen ryhmään, sillä niitä ei voida tunnistaa ollenkaan nykytekniikan sähkökemiallisilla antureilla (Robinson et al. 2008).

Kuvassa 13 on havainnollistettu värein tätä jakoa: vihreät ovat sähköisesti aktiivisia, punaiset sähköisesti inaktiivisia ja havaittavissa ja siniset sähköisesti inaktiivisia, mutta eivät ole havaittavissa nyky menetelmin. Kuvassa on esitetty välittäjäaineiden lisäksi askorbiinihappo ja virtsahappo, jotka ovat tärkeitä häiriötekijöitä mittauksille ja joita esitellään kappaleessa 3.3.



Kuva 13. Välittäjäaineiden, askorbiinihapon ja virtsahapon sähköinen aktiivisuus.

3.2.3 Välittäjäaineiden hapettumisjännite

Jokaisella aineella on oma keskimääräinen hapettumisjännitteensä fysiologisessa pH-arvossa (Robinson et al. 2008). Hapettumisjännite on jännite, joka tarvitaan tietyn molekyylin hapettamiseen. Sähkökemiallisissa mittauksissa on tärkeää tietää kuinka suurta jännitettä on käytettävä, jotta haluttu aine hapettuu. Taulukossa 2 on esitetty muutamien välittäjäaineiden ja seuraavassa kappaleessa esiteltävien askorbiinihapon ja virtsahapon hapettumisjännitteet.

Taulukko 2. Hapettumisjännitteet fysiologisessa pH-arvossa (Robinson, 2008).

Aine	Hapettumisjännite
Dopamiini	+ 0,20 V
Noradrenaliini	+ 0,20 V
Serotoniini	+ 0,35 V
Askorbiinihappo	+ 0,20 V
Virtsahappo	+ 0,30 V

3.3 Häiriötekijät mittauksessa

Solunulkoisessa nesteessä on välittäjäaineiden lisäksi paljon muita molekyyliä, joista osalla on vaikutusta sähkökemiallisiin välittäjäainemittauksiin. Häiriöitä mittauksiin aiheuttavat ne molekyylit, joiden hapettumisjännite on lähellä mitattavan välittäjäaineen

hapettumisjännitettä. Näitä häiriötekijöitä ovat askorbiinihappo ja virtsahappo (Kumar et al. 2010).

3.3.1 L-askorbiinihappo

L-askorbiinihappoa, eli askorbaattia tai vitamiini C:tä, tarvitaan kollageenin biosynteesiin, jotta kollageenikuidut kasvavat ja vahvistuvat (Guyton & Hall 1996). Sillä on myös tärkeä rooli soluissa tapahtuvissa hapettumis-pelkistymisreaktioissa (Hart et al. 2003). Askorbaatin määrä aivoissa ja muissa kudoksissa on 100 - 500 μM (Burmeister & Gerhardt 2003a, O'Neill 1994), mikä tekee siitä yhden vallitsevista molekyyleistä aivoissa. Askorbaatin vaikutus mittauksiin on ollut ensimmäisiä ongelmia kehitettäessä selektiivisiä sähkökemiallisia menetelmiä. Ongelma johtuu siitä, että askorbaatin hapettumisjännite on lähellä dopamiinin ja noradrenaliinin hapettumisjännitteitä (ks. taulukko 2). (Michael & Borland 2007)

3.3.2 Virtsahappo

Virtsahappoa esiintyy kaikkialla elimistössä (Becker 1993). Se esiintyy fysiologisessa pH:ssa 98 %:sesti sen suola-muodossa, eli uraattina (Wright et al. 2010). Virtsahappoa on solunulkoisessa nesteessä aivoissa noin 1 - 50 μM (O'Neill 1994). Vaikka sen määrä solunulkoisessa nesteessä onkin huomattavasti pienempi kuin askorbaatin, on virtsahappo toinen selektiivisten sähkökemiallisten menetelmien ongelmista.

4 Välittäjäaineiden mittaamiseen käytettävät elektrodit

Elektrodin suunnittelun ja valmistuksen merkittävimmät haasteet muodostuvat sen käytöstä fysiologisessa ympäristössä keskushermostossa. Tämä asettaa rajoitteita elektrodien koolle ja käytettäville materiaaleille. Hermosolun koko ja sen ja elektrodin välinen etäisyys vaikuttavat aina mittausten laatuun (Cogan 2008). Lisäksi sähkökemiallisissa mittauksissa käytettävien elektrodien sähköiset ominaisuudet on myös huomioitava.

Elektrodimateriaalit ovat kehittyneet paljon viimeisten 40 vuoden aikana. Mikrokoon elektrodeja voidaan valmistaa ja niiden vasteajat ovat riittäviä välittäjäaineiden mittaamiseen. Yhden tietyn aineen mittaamiseksi ja sähköisesti inaktiivisten aineiden mittaamiseksi on löydetty ratkaisuja lisäämällä elektrodin pinnalle pinnoitteita ja entsyymejä. Elektrodien havaitsemisrajat eivät kuitenkaan ole vielä sillä tasolla, jota aineiden tarkka havainnointi vaatii. (Davis et al. 1995)

Elektrodimateriaalin valinnassa on tärkeää ottaa huomioon aineen sähkökemiallisen ikkunan rajat, eli rajat joiden sisällä jännitettä voidaan turvallisesti pitää ilman, että syntyy esimerkiksi katalyyttisiä reaktioita tai ei-toivottuja sivuvaikutuksia, kuten kaasunmuodostusreaktioita. Nämä rajat riippuvat valitusta elektrodista ja elektrolyyttiliuoksesta. On myös tärkeää tutkia taustavoltammogrammi, jotta tunnetaan mahdollisesti syntyvien pintaoksidien muodostumisen aiheuttavat käyränmuodot, eikä niitä sekoiteta tutkittavan elektrodin ja elektrolyytin ominaisuuksiin. (Scholz 2010)

Elektrodimateriaalit voidaan jakaa elektrodin pohjamateriaaleihin ja pinnoitemateriaaleihin. Pohjamateriaali on elektrodin varsinainen mittaava osa, ja pinnoite vaikuttaa esimerkiksi elektrodin selektiivisyyteen ja bioyhteensopivuuteen. Pinnoitteella onkin oikeastaan suurempi merkitys anturin kannalta, sillä se on ensimmäinen rajapinta kudoksen ja elektrodin, sekä mitattavien aineiden ja elektrodin välillä. Elektrodeja päällystetään erilaisilla pinnoitteilla, jotta vältetään rajoitteilta, joita elektrodimateriaalit pinnoittamattomina aiheuttavat sähkökemialliseen tutkimustyöhön. Pinnoitteilla voidaan parantaa elektrodin herkkyttä ja selektiivisyyttä joillekin analyyteille, sekä ehkäistä pinnan likaantumista. Likaantumista aiheutuu, kun hapettumistuotteita adsorboituu elektrodin pinnalle. (Robinson et al. 2008)

Tässä luvussa kerrotaan elektrodin vaatimuksista koon ja sähköisten ominaisuuksien suhteen, minkä jälkeen käytetyt elektrodimateriaalit ja -pinnoitteet esitellään. Tämän jälkeen käydään läpi eri välittäjäaineiden selektiiviseen mittaamiseen tutkittuja elektrodeja. Elektrodiratkaisuja esitellään jälleen vain kappaleessa 2.1 valittujen välittäjäaineiden mittaamiseen.

4.1 Elektrodin vaatimukset ja materiaalit

Jotta elektrodin sähköiset ominaisuudet ja bioyhteensopivuus täyttäisivät implantoitavalta elektrodilta vaaditut ominaisuudet, on tietyt vaatimukset otettava

huomioon. Näitä vaatimuksia esitellään kappaleessa 4.1.1. Kappaleessa 4.1.2 esitellään sopivia elektrodimateriaaleja ja -pinnoitteita.

4.1.1 Vaatimukset

Tässä kappaleessa esiteltävät vaatimukset liittyvät oikeastaan kaikki toisiinsa. Mitä pienempi elektrodi on, sitä paremmin se on bioyhteensopiva, mutta sitä isompi sen impedanssi myös on. Nämä kolme ominaisuutta on otettava huomioon erityisesti pitkäikäistä elektrodia suunnitellessa.

Koko

Elektrodeja tehdään sekä mikro- että makrokokoluokissa. Makroelektrodeja käytetään lähinnä vain *in vitro* -kokeisiin, ja *in vivo* -kokeet vaativat yleensä mikrokokoisia elektrodeja. Makroelektrodit ovat geometriseltä pinta-alaltaan yleensä yli 0,001 cm² ja vastaavasti mikroelektrodit tätä pienempiä (Cogan 2008).

Elektrodin halutaan olevan mahdollisimman pieni, koska ideaalitilanteessa se sijoitettaisiin synapsirakoon. Käytännössä tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, koska jo pienikin liike saattaa liikuttaa elektrodin pois paikaltaan. Elektrodien on oltava kuitenkin tarpeeksi pieniä, jotta ne välittävät luotettavaa tietoa solunulkoisen nesteen kemiallisesta koostumuksesta hermosolujen ympärillä. Niiden geometrinen selektiivisyys on sitä parempi, mitä pienempi elektrodi on. Myös elektrodin ja elektrodi-elektrolyytti -rajapinnan impedanssin on oltava mahdollisimman alhainen, jotta kohina häiritsee mahdollisimman vähän. (Wightman et al. 1988) Lisäksi elektrodin pieni koko pitää elektrodin aikavakion matalana, jolloin se myös pystyy nopeisiin mittauksiin (Robinson et al. 2008). Elektrodin on oltava myös mahdollisimman ohut, jotta kudosaauriot elektrodin implantoimisreitillä olisivat mahdollisimman pieniä. Kuitenkin sen on oltava myös tarpeeksi jäykkä, ettei elektrodin pää tai varsi muuta muotoaan ja kärsi implantoitaessa. (Loeb et al. 1995)

On kuitenkin muistettava, että mitä pienempi pinta-ala elektrodilla on, sitä suurempaa virtaa ja virrantiheyttä sen on kestävä. Se ei saa aiheuttaa sähkökemiallisia reaktioita, jotka saattavat vahingoittaa elektrodia tai kudosta sen ympärillä (Meyer et al. 2001). Sen takia elektrodilta toivotaan pienen koon lisäksi laajaa pinta-alaa.

Impedanssi

Elektrodin impedanssilla on vaikutusta kohinaan, ja mitä pienempi impedanssi on, sitä suurempi signaali-kohinasuhde on. Elektrodin impedanssin halutaan siis olevan pienin mahdollinen. Hermostoa mittaavien elektrodien impedanssista puhuttaessa tarkoitetaan yleensä niiden impedanssia fysiologisesti tärkeällä 1 kHz:n taajuudella. Biologisen kudoksen permittiivisyyden tiedetään vaihtelevan taajuuden funktiona. 1 kHz:n ja 10 MHz:n välisellä taajuusalueella sähkökenttä läpäisee solukalvot. 1 kHz on siksi valittu yleiseksi taajuudeksi impedanssin määrittämiseen hermostoa mittaaville elektrodeille. (Lu et al. 2008, McConnell et al. 2009) Elektrodien impedanssi *in vivo* vaihtelee noin 50 kΩ:n ja 1 MΩ:n välillä. (Cogan 2008) Impedanssi kasvaa, kun elektrodi ja sen pinta-ala pienenee (Nyberg et al. 2007). Elektrodin materiaaliin on myös kiinnitettävä erityistä huomiota, sillä se vaikuttaa niin impedanssiin, kuin muihinkin elektrodin sähköisiin ominaisuuksiin.

Biohyteensopivuus

Elektrodin tulee olla biohyteensopiva, jotta se ei vahingoita kudosta sen ympärillä, eikä elektrodi vahingoitu kudoksessa. Biohyteensopivuuteen liittyy niin kudoksen, kuin elektrodin tasainen toimintakyky. Elektrodin tasaisen toimintakyvyn saavuttaminen on yksi suurista haasteista suunnittelussa ja valmistuksessa. (Cogan 2008)

Epäsuotuisan kudostavasteen on huomattu aiheutuvan joko implantointitraumasta erityisesti elektrodin kärjessä (Edell et al. 1992) tai kudoksen muodostaessa gliasolukapselin ainakin osittaisesti keholle vieraan elektrodimateriaalin ympärille (Szarowski et al. 2003, Turner et al. 1999). Gliasolukapseli implantoidun elektrodin ympärillä eristää sähköisesti elektrodin aivokudoksesta, johtaen kasvavaan impedanssiin ja matalampaan signaali-kohinasuhteeseen. Tämä johtaa elektrodin suorituksen huononemiseen ja siksi myös elektrodin hylkäämiseen hermostoa mittaavana anturina. (Sommakia et al. 2009) Epäsuotuisa kudostavaste saattaa johtua myös elektrodin mikroliikkeestä (Kim et al. 2004a). Elektrodien suunnittelussa on tärkeää ottaa huomioon myös elektrodin ympärillä olevan kudoksen mahdollinen muuttuminen ajan kuluessa.

Jo implantoidun elektrodin toimintakyvyn parantamiseksi on tutkittu uudistamista (engl. *rejuvenation*), jonka tarkkaa vaikuttamistapaa ei kuitenkaan tunneta. Tasavirtajännitteen syöttäminen laajoilla amplitudeilla parin sekunnin ajan on huomattu vaikuttavan gliasolukapselin muodostumisen jälkeen positiivisesti signaali-kohinasuhteen pysymiseen hyvänä ja impedanssin madaltamiseen. On huomattu, että yhden kerran syötetyn virran vaikutus kesti alle viikon ja kahden kuukauden aikana useamman kerran syötetty virta piti signaali-kohinasuhteen hyvänä (Johnson et al. 2005). Tällä tavoin on pystytty parantamaan elektrodin mittaustulosta kroonisessa käytössä. Uudistamisen uskotaan liittyvän hetkellisesti löysentyviin liitoskohtiin gliasolukapselin aktivoitujen astrosyyttien välillä. (Sommakia et al. 2009)

4.1.2 Käytettävät materiaalit

Platina, kulta ja hiili ovat olleet perinteisesti käytetyimpiä elektrodimateriaaleja niiden hyvän suorituskyvyn takia (Davis et al. 1995, Scholz 2010). Lisäksi mittaavien elektrodien materiaaleina on käytetty esimerkiksi platina-iridium -seosta, poly(3,4-etyleenidioksitiofeeni):ä (PEDOT), piitä ja keraamia. Tässä kappaleessa esitellään yleisimmin käytössä olevat elektrodimateriaalit, eli platina, kulta ja hiili.

Platina ja kulta

Platinalla on hyvät sähköiset ominaisuudet elektrodimateriaaliksi. Platinaelektrodien ongelmana on kuitenkin biolikaantuminen ja pieni sähkökemiallinen ikkuna (Robinson et al. 2008). Platinaa on käytetty sähköä johtavana osana erilaisissa mikroelektrodimatriiseissa, joissa elektrodin pohjana toimii jokin muu kuin platina (Burmeister et al. 2002). Platina on lisäksi hyvin pehmeä metalli. Siihen lisätään usein 10 - 20 % prosenttia iridiumia kovetusaineeksi, jotta se olisi jäykempää.

Kultaa käytetään elektrodimateriaalina, koska se on kemiallisesti hyvin stabiili ja biohyteensopiva (Xiao et al. 2004). Kultaelektrodeja ei voida sellaisenaan käyttää sähköisesti aktiivisten aivojen välittäjäaineiden sähkökemialliseen tunnistamiseen, sillä

ongelmana on biolikaantuminen ja pieni sähkökemiallinen ikkuna esimerkiksi hiilielektrodeihin verrattuna (Robinson et al. 2008). Sähkökemiallisen ikkunan ylityksestä aiheutuu elektrodin syöpymistä, jonka vaikutuksesta impedanssi kasvaa ja mittausherkeytyys laskee. Nykyisin sen käyttö elektrodeissa keskittyy lähinnä vain kullan käyttämiseen johtimena muusta aineesta rakennetussa elektrodissa. Kultaa käytetään siis mittausalueena, mutta muu elektrodi valmistetaan esimerkiksi piistä (Cui et al. 2001, Kim et al. 2004b, Xiao et al. 2004).

Platinaa ja kultaa on perinteisesti käytetty hermoelektrodeissa, mutta niiden huono puoli on, että liuoksen sisältäessä kloridia ne voivat liueta anodisen pulssin aikana. Ne ovat siis herkkiä korroosiolle. Erityisesti pitkäaikaisessa käytössä tällä saattaa olla hyvinkin merkittäviä negatiivisia vaikutuksia. Platinaa ja kultaa päällystetäänkin usein polymeerikalvolla edellä mainittujen ongelmien välttämiseksi. (Cogan 2008, Hibbert et al. 2000, Scholz 2010)

Hiili

Hiilimateriaalit ovat olleet suosittuja elektrodimateriaaleja, sillä niiden jänniteikkuna on laaja vesiväliaineissa, ne ovat edullisia ja ne ovat kemiallisesti reagoimattomia useimmissa elektrolyyttiliuoksissa. Bioelektrodeissa on käytetty hiilen eri allotrooppeja eri muodoissa, kuten hiilipastaa, lasihiiltä (Chen et al. 2009, Huber et al. 1998, Huong et al. 2009, Liu et al. 2008), grafeenia (Alwarappan et al. 2009), hiilinanoputkia (Banks & Compton 2005, Tang et al. 2004) ja hiilikuituja (Peters et al. 2004). (Huang et al. 2010) Nämä kaikki esitellään lyhyesti ja hiilinanokuidut vähän tarkemmin, sillä ne ovat tutkituin hiilielektrodimateriaali tällä hetkellä.

Ensimmäiset voltammetriassa käytetyt keskushermoston mikroelektrodit valmistettiin **hiilipastasta** (O'Neill 2005). Hiilipastaelektrodien on tutkittu olevan stabiileja *in vivo* yli kuukauden. Niiden suuri koko kuitenkin rajoittaa niiden käyttöä vain isoihin aivoalueisiin. Lisäksi suuri elektrodi aiheuttaa enemmän kudosisäilyä, kuin pienemmät elektrodit. Elektrodit voidaan valmistaa sekoittamalla hiilijauhetta Nujoliin (eräänlainen öljysuspensio) tai piiöljyyn ja pakkaamalla seos Teflonilla eristettyjen metallisten mikrolankojen päähän. Tuloksena on levyelektrodeja, joiden halkaisija on 100 - 300 µm. Elektrodin voi myös valmistaa täyttämällä lasikapillaari hiilipastalla. (Robinson et al. 2008)

Lasihiili on bioyhteensopiva elektrodimateriaali. Se on erittäin kova ja sähköä johtava, sekä kemiallisesti reagoimaton ja kaasuille ja nesteille läpäisemätön. Se on halpaa, ja siitä voidaan valmistaa erikokoisia ja erimuotoisia paloja. Lasihiilen käyttö elektrodimateriaalina on kuitenkin rajoittunut makrokokoisten elektrodien tekoon (Karyakin et al. 2000, Wang et al. 2006). Tutkimuksissa on käytetty esimerkiksi ohuita suorakulmion muotoisia lasihiililevyjä. (Huber et al. 1998)

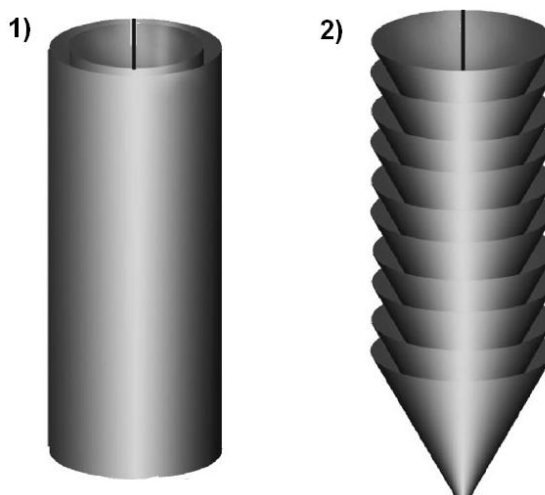
Grafeeni on kaksiulotteinen levy hiiliatomeja. Sillä on erittäin suuri pinta-ala, suuri mekaaninen lujuus, korkea elastisuus ja lämmönjohtavuus. Se on myös edullista. Lisäksi grafeenilla on kaksi etua verrattuna hiilinanoputkiin: grafeenilla ei ole metallisia epäpuhtauksia kuten hiilinanoputkilla ja grafeenin valmistukseen tarvitaan vain grafiittia, joka on halpaa ja helposti saatavilla. (Pumera et al. 2010) Grafeeni on

oikeastaan perusta muille anturisovelluksissa käytetyille rakenteille: grafeeni voidaan rullata yksiulotteisiksi nanoputkiksi tai pinota kolmiulotteiseksi grafiitiksi (Alwarappan et al. 2009).

Vuonna 1991 Iijima löysi neulamaiset **hiilinanoputket**, joiden halkaisija oli pienimmillään 2,2 nm (Iijima 1991). Siitä lähtien niiden ominaisuuksia ja käyttökohteita on tutkittu paljon. Niiden etuja on pieni koko ja jäykkyys (Wang & Lin 2008), korkea sähkönjohtavuus sekä suuri pituus-halkaisijasuhde (Chakraborty & Raj 2007). Kuvassa 14 kohdassa 1) on esitetty hiiliputken malli. Hiilinanoputkien on huomattu voivan parantaa tärkeiden biomolekyylien sähkökemiallista reaktiivisuutta ja mahdollistaa tehokasta elektroninsiirtoreaktiota elektrodin pohjamateriaalin ja entsyymaattisen kerroksen hapetus-pelkistyskeskittymien välillä. Kiinnittämällä hiilinanoputkia lasihiilielektrodin pinnalle on voitu lieventää pinnan likaantumista ja parantaa elektrodin stabiiliutta. (Musameh et al. 2002, Wang 2005)

Hiilinanoputkia on sekä yksiseinäisiä (engl. *single-walled carbon nanofiber*, SWCNT) että moniseinäisiä (engl. *multi-walled carbon nanofiber*, MWCNT). SWCNT:t muodostuvat yhdestä ainoasta rullatusta grafeenilevystä, joka muodostaa putken 1 - 2 nm halkaisijalla. MWCNT:t puolestaan rakentuvat samankeskisistä pienistä grafeeniputkista. MWCNT:ien halkaisija on 2 - 50 nm ja niiden kerrosten väliset etäisyydet noin 0,34 nm. (Wang & Lin 2008)

Vuonna 1978 käytettiin ensimmäisen kerran **hiilikuitua** elektrodimateriaalina. Se on sylinterimäinen rakenne, joka muodostuu useista grafeenikerroksista. Erilaisia rakenteita on useita, ja kuvassa 14 kohdassa 2) on malli yhdestä rakenteesta. Tässä mallissa kerrokset ovat järjestäytyneet päällekkäin kuin kartiot.

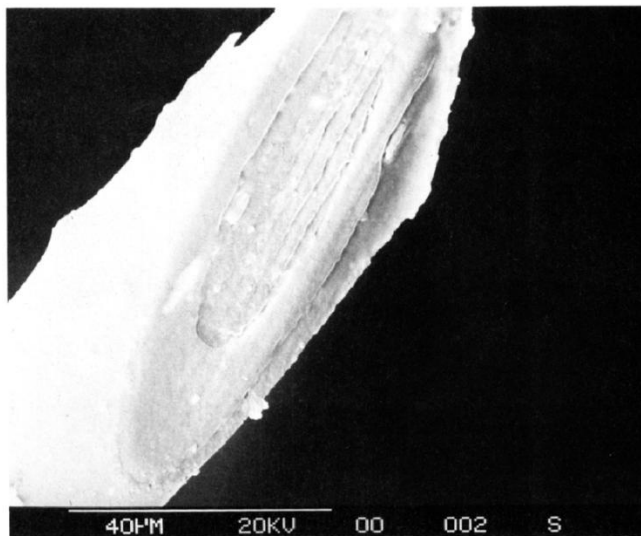


Kuva 14. Vasemmalla on mallikuva hiiliputkesta (1) ja oikealla hiilikuidusta (2) (muokattu lähteestä: Melechko et al. 2005).

Hiilinanokuidulla on erittäin hyvät fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, esimerkiksi hyvä sähkönjohtavuus, suuri pinta-ala, bioyhteensopivuus ja valmistuksen helppous. Lisäksi se on kemiallisesti ja sähkökemiallisesti vakaa. Hiilinanokuidun koko ja grafiittijärjestys ovat myös hyvin kontrolloitavissa. (Huang et al. 2010, Lu et al. 2008, Vamvakaki et al. 2006, Wang & Lin 2008) Niitä on tutkittu paljon erilaisiin

sovelluskohteisiin viime vuosikymmenten aikana, mutta vasta viime vuosina hiilinanokuituja on tutkittu laajalti bioantureiden kehittämiseksi.

Hiilikuidut ovat halkaisijaltaan useimmiten 5 - 15 μm (Huang et al. 2010). Hiilinanokuidut puolestaan ovat pituudeltaan mikrometrien luokkaa, ja niiden halkaisija on 30 nanometristä (Wu et al. 2007) 200 nanometriin (Vamvakaki et al. 2006). Hiilikuituelektrodi valmistetaan työntämällä hiilikuitu lasikapillaariin ja vetämällä kuitua ulos pipettivetimellä. Ulos vedettyä päätä leikataan, jotta saadaan sylinterimäinen elektrodi, tai se hiotaan levyelektrodiksi. (Robinson et al. 2008) Kuvassa 15 on esitetty poikkileikkaus hiilikuidusta.



Kuva 15. Nafionilla päällystetty hiilikuituelektrodi (Wightman et al. 1988).

Hiilinanokuidut ovat siinä mielessä ainutlaatuisia, että niiden koko pinta-ala voidaan aktivoida. Niiden aktivoiminen typpihapolla tai sähkökemiallisella hapettamisella voi synnyttää happea sisältäviä ryhmiä ilman niiden pääketjun rakenteellisen eheyden heikkenemistä. Koska hiilinanokuidulla on paljon suurempi toiminnallinen pinta-ala kuin hiilinanoputkilla, pinta-aktiivisten ryhmien suhde tilavuuteen on näillä materiaaleilla paljon suurempi kuin lasimaisilla hiilinanoputkien pinnoilla. Näiden ominaisuuksien takia hiilinanokuidut voivat olla ideaaleja kiinnitysmatriiseja biomolekyyleille samanaikaisesti kun ne voivat välittää sähkökemiallisia signaaleja. (Vamvakaki et al. 2006)

Hiilikuituelektrodien kudokselle aiheuttaman vaurion on tutkittu olevan pientä. 3,5 μm :n paksuiset hiilikuidut aiheuttivat suurimman kudoksen vaurion 2,5 μm :n säteelle elektrodin pinnasta. Sen ympärillä oli 4 μm :n rengasmaisen alue, jossa oli sekä terveitä että vaurioituneita alueita. Tämän renkaan ympärillä, eli 6,5 μm :n päässä elektrodin pinnasta ja pahimmista vaurioista, ei esiintynyt enää juurikaan elektrodiin liitettäviä vaurioita. (Peters et al. 2004) Kuitenkin mikä tahansa vaurio kudokselle on aina haitallista, joten tätäkin vauriota olisi pienennettävä.

Hiilinanokuitujen ja -putkien ensisijainen erottava tekijä on niiden pinta-ala, kun niiden halkaisijat ja pituudet ovat samoja. Hiilikuidun pinta-ala on suurempi, sillä kuitujen ulkoseinällä on lovia, toisin kuin putkien ulkoseinällä. Tämä johtuu erimuotoisten

grafeenilevyjen pinoutumisesta kuidussa ja johtaa suurempaan pinta-alaan. (Kim & Lee 2004c) Lovet myös saattavat helpottaa sähköisesti aktiivisten analyyttien elektroninsiirtoa (Banks & Compton 2005).

4.1.3 Pinnoitteet

Sähköä johtavia polymeeripinnoitteita on tutkittu paljon elektrodien ominaisuuksien kehittämiseksi. Sähkönjohtavuus saadaan aikaan seostamalla eristäviin polymeereihin aineita, jotka muodostavat varauksensiirtorakenteita. Aineet voivat olla hapettavia tai pelkistäviä. Tällöin alkuperäisestä polymeerirungosta tulee negatiivisesti tai positiivisesti varautunut, ja seosaine muodostaa vastakkaisesti varautuneita ioneja. (Naarmann 2000) Sähköä johtavat polymeeripinnoitteet voivat parantaa elektrodin sähkökatalyyttisiä ominaisuuksia, kuten laskea yliäänitettä, kasvattaa reaktionopeutta, parantaa vakautta ja toistettavuutta elektrodivasteelle, lisätä herkkyyttä ja selektiivisyyttä, vähentää häiriötekijöiden vaikutuksia ja kiinnittää indikaattorimolekyylejä (Liu et al. 2008, Xiao et al. 2004). Lisäksi elektrodeja voidaan pinnoittaa myös esimerkiksi iridiumoksidilla parempien sähköisten ominaisuuksien saavuttamiseksi. Tässä kappaleessa keskitytään elektrodin sähköisten ominaisuuksien ja bioyhteensopivuuden kannalta olennaisiin pinnoitteisiin. Kappaleessa 4.2 esitellään tarkemmin selektiivisyyteen vaikuttavia pinnoiteratkaisuja, sillä selektiivisyys on tällä hetkellä välittäjäaineantureiden suurin haaste.

Polypyrroli

Polypyrroli-polymeeripinnoitteella on saatu laskettua elektrodin impedanssia (Kim et al. 2004b), parannettua varauksensiirtoa (Keefer et al. 2008) ja kasvatettua pinta-alaa (Cui et al. 2001). Oikeastaan nämä kaikki kolme asiaa toimivat keskenään: kun pinta-ala kasvaa, impedanssi laskee ja varauksen siirto tehostuu (Yang & Martin 2004). Lisäksi polypyrroli on pehmeää, se on helppo valmistaa, sillä on suuri sähkönjohtavuus, säädettävissä olevat pintaominaisuudet, se on yhteensopiva nisäkkäiden solujen kanssa ja se on biologisesti aktiivinen. Polypyrrolin kemiallisen rakenteen kestävyys fysiologisissa olosuhteissa on kuitenkin huono, ja polypyrroli saattaa ylihapettuuessaan johtaa polymeerin hajoamiseen. (Xiao et al. 2004, Yang et al. 2005)

PEDOT

Poly(3,4-etyleenidioksidiofeeni) eli PEDOT on polymeeri, jolla pinnoitettuja elektrodeja on tutkittu. PEDOT on pehmeää, joustavaa, helppo valmistaa ja hyvin sähköä johtava. Sillä on matala impedanssi, se on biologisesti aktiivinen ja se on vakaampi kuin monet muut polymeerit. (Yang et al. 2005) Sen on huomattu kasvattavan elektrodin käyttöikää parantamalla sen signaali-kohinasuhdetta (Ludwig et al. 2006), minkä vuoksi PEDOT on hyvä kandidaatti biologisiin anturisovelluksiin. Sen on todettu lisäksi olevan sähköisesti aktiivinen vesiliuoksessa, ja se on vakaampi kuin polypyrroli. (Yang & Martin 2004)

Iridiumoksidi

Cogan et al. tutkivat sputteroidulla iridiumoksidifilmillä (engl. *sputtered iridium oxide film*, SIROF) pinnoitettuja platinaelektrodeja verraten niitä pinnoittamattomaan platinaelektrodiin. Mittaavat ja stimuloivat elektrodit vaativat usein parempaa

varaukseninjektio-kykyä ja impedanssitasoja kuin jalometallit pystyvät tarjoamaan. SIROF:in varaukseninjektio-kyky on parempi kuin platinan, ja se on tiiviimpi ja fysikaalisesti kestävämpi kuin anodinen iridiumoksidifilmi (engl. *activated iridium oxide film*, AIROF). SIROF:in on myös todettu sietävän ylipulssitusta paremmin kuin AIROF tai EIROF (engl. *electrochemical deposition of iridium oxide film*) ja on tämän vuoksi houkutteleva vaihtoehto niille. (Cogan et al. 2004)

4.2 Elektrodin selektiivisyyttä parantavat pinnoitteet

Elektrodien suunnittelussa on erittäin tärkeää ottaa huomioon niiden selektiivisyys. On tiedettävä mitä molekyylejä tutkittavassa ympäristössä esiintyy, mitä molekyyliä halutaan mitata, ja miten varmistetaan, että mittaus todellakin mittaa vain juuri haluttua ainetta. Selektiivisyyden parantamiseksi elektrodin on oltava pieni ja se voidaan pinnoittaa erilaisilla aineilla. Selektiivisyyttä tietyille aineille voidaan lisätä myös entsyymeillä. Entsyymit eivät ole varsinaisia pinnoitteita, vaan ne lisätään pinnoitemateriaaliin tai kiinnitetään elektrodin pinnalle. Entsyymit katalysoivat tarkasti halutun aineen hapettumis- ja pelkistymisreaktioita. Entsyymejä käytetään erityisesti kappaleessa 3.2.2 esitellyille sähköisesti inaktiivisille välittäjäaineille, joita ei muutoin voida havaita sähkökemiallisin menetelmin.

Tässä kappaleessa keskitytään välittäjäaine-kohtaisesti pinnoiteratkaisujen esittelyyn. Lisäksi Nafion-pinnoite esitellään tarkemmin, sillä sitä on tutkittu usean eri välittäjäaineen mittaamiseksi. Se on ainutlaatuinen pinnoite poistamaan negatiivisesti varautuneiden aineiden vaikutusta mittaukseen. Siksi se on myös valittu tutkittavaksi tämän työn kokeellisessa osuudessa.

4.2.1 Pinnoiteratkaisut välittäjäaineittain

Tässä kappaleessa esitellään tutkimuksissa kokeiltuja elektrodimateriaali-, pinnoite- ja entsyymiratkaisuja eri välittäjäaineille. Erityisesti matalan havaitsemisrajan elektrodeja valittiin esiteltäviksi. Käsiteltävät välittäjäaineet ovat asetyylikoliini, glutamaatti, gamma-aminovoihappo, dopamiini, noradrenaliini ja serotoniini. Entsyymien lisäys elektrodin pinnalle on tarpeellista sähköisesti inaktiivisten (ks. kappale 3.2.2) välittäjäaineiden havaitsemiseksi. Entsyymeillä saadaan aikaan aineen hajoaminen, jolloin sen sähköisesti aktiivinen reaktiotuote voidaan havaita elektrodilla.

Asetyylikoliini

Asetyylikoliini on positiivisesti varautunut, mutta sähköisesti inaktiivinen (ks. kappaleet 3.2.1 ja 3.2.2). Sitä voidaan kuitenkin mitata lisäämällä entsyymejä elektrodin pinnalle. Tällä tavoin ei kuitenkaan saada pitkäikäisiä elektrodeja, sillä entsyymit menettävät aktiivisuuttaan perinteisten kiinnitysmenetelmien (silloittaminen ja polymeerigeeliin vangitseminen) aikana. Tästä johtuen vasteet eivät ole tasaisia käytön aikana, eikä elektrodien valmistuksen toistettavuus hyvä. (Shimomura et al. 2009) Tämän vuoksi asetyylikoliinielektrodi-ratkaisuja on kehitetty useita erilaisia. Asetyylikoliinia esiintyy solunulkoisessa nesteessä noin 0,026 - 0,044 μM , joten elektrodin tarkkuuden on oltava nanomolaarisuuden luokkaa.

Shimomura et al. kehittivät uudenlaisen tavan kiinnittää entsyymit: asetyylikoliiniesteraasi (AChE) ja koliinioksidaasi (ChOx) kiinnitettiin mesohuokoiseen kalvoon. He kiinnittivät platinaelektrodin mittausalueille nämä kalvot, ja mittaukset perustuivat vetyperoksidin (H_2O_2) mittaamiseen. Tämän elektrodin toiminta perustui kahden entsyymin vaikutukseen. Ensimmäisessä reaktiossa AChE hydrolysoi aineen koliiniksi ja asetaatiksi. Seuraavassa reaktiossa ChOx hapettaa koliinin tuottaen betaiinia ja vetyperoksidia. Tämän jälkeen vetyperoksidi hapettuu sähkökemiallisesti elektrodilla ja syntyvä virta mitataan. Virta kertoo alkuaineen konsentraatiosta, mutta siihen vaikuttaa myös entsyymien toiminta. (Shimomura et al. 2009) Elektrodin kalvon todettiin olevan havaitsemisrajoiltaan $6,0 - 800 \mu\text{M}$, joten se ei riitä asetyylikoliinin normaalikonsentraatioiden mittaamiseen. Elektrodilla oli kuitenkin pitkä käyttöikä. Se toimi 80 päivän kuluttua edelleen 80 % vasteella. (Shimomura et al. 2009)

Rahman puolestaan valmisti asetyylikoliini-anturin sirukortista. Sirun päälle kiinnitettiin asetyylikoliinioksidaasia (AChOx). Siru valmistettiin valolitografisella menetelmällä. Asetyylikoliinin mittaaminen perustui vetyperoksidin mittaamiseen, koska asetyylikoliini hajoaa AChOx:n vaikutuksesta, ja tästä syntyy koliinia, asetaatti-ioni ja vetyperoksidia. Tämän jälkeen H_2O_2 hajoaa itsestään tuottaen vapaita elektroneja, eli virtaa. Tämä virta on suoraan verrannollinen asetyylikoliinin pitoisuuteen liuoksessa. Elektrodin herkkyys oli $7,3543 \pm 0,2 \mu\text{A}/(\mu\text{Mcm}^2)$, ja sen havaitsemisraja oli $0,1392 \pm 0,005 \text{ nM}$. Elektrodin huomattiin säilyttävän herkkyytensä yhden kuukauden ajan, jonka jälkeen sen vaste väheni asteittaisesti. Häiriöaineiden vaikutusta mittaukseen mitattiin myös $0,1 \text{ mM}$ asetyylikoliinikonsentraatiolla, ja todettiin, että $0,1 \text{ mM}$ konsentraatiot virtsahappoa, glutamaattia, laktaattia tai glukoosia eivät häirinneet mittauksia tällä konsentraatiolla. (Rahman 2011) Tämän elektrodin herkkyys riittää mittaamaan asetyylikoliinia, mutta sen käyttöä pidentäminen olisi suotavaa.

Asetyylikoliinia on onnistuttu mittaamaan myös ilman entsyymejä. Sattarahmady et al. kehittivät nanokokoisen pallonmuotoisen nikkeli kuoren, johon kiinnitettiin hiilihiukkasia ja Nafionia. Havaitseminen perustui nikkelin aiheuttamaan asetyylikoliinin hapettumiseen. Elektrodi ei likaantunut asetyylikoliinin ja sen reaktiotuotteiden vaikutuksesta 50 peräkkäisellä syklillä. Herkkyuden ja havaitsemisrajan todettiin olevan parempia kuin muut siihen mennessä kirjallisuudessa esitetyt tulokset. Saavutettu herkkyys oli $48,58 \pm 0,52 \text{ mA}/(\text{Mcm}^2)$ ja havaitsemisraja $49,33 \text{ nM}$. (Sattarahmady et al. 2010) Tämän havaitsemisraja kuitenkin häviää Rahmanin (Rahman 2011) elektrodille, eikä 50 peräkkäisen syklin käyttöä vielä riitä krooniseen käyttöön tarkoitettavaan elektrodin.

Glutamaatti

Glutamaatin mittaamiseksi sähkökemiallisin menetelmin täytyy käyttää entsyymejä, sillä glutamaatti on sähköisesti inaktiivinen (ks. kappale 3.2.2). Lisäksi se on negatiivisesti varautunut (ks. kappale 3.2.1). Glutamaatin havaitsemiseksi elektrodipinnoitteeseen voidaan lisätä glutamaattioksidaasia (GluOx) tai glutamaattidehydrogenaasia (GluDh), jotka katalysoivat glutamaatin hajoamisreaktion, jolloin se voidaan havaita. (Chakraborty & Raj 2007, Pan & Arnold 1996) Glutamaatin

konsentraatio solunulkoisessa nesteessä on noin 4 - 350 μM , sitä esiintyy siis huomattavasti enemmän kuin muita tässä työssä esiteltäviä välittäjäaineita.

GluOx hajottaa glutamaatin, ja reaktiotuotteena syntyy vetyperoksidia. Se puolestaan voidaan hajottaa joko suoralla hapettamisella tai käyttämällä piparjuuriperoksidaasi-entsyymiä. Vetyperoksidin havaitseminen sen hapettamisella vaatii kuitenkin korkeata ylijännitettä ja se yleensä lisää myös havaittavien aineiden määrää, jolloin halutun aineen aiheuttamaa vastetta on vaikea enää erottaa joukosta. Glutamaatin mittaaminen perustuu siis vetyperoksidin mittaamiseen GluOx:ia käytettäessä. (Chakraborty & Raj 2007)

GluDh:in käyttö sähkökemiallisissa antureissa perustuu glutamaatin hajoamiseen ja nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin (NADH) mittaamiseen. Anturin on siis oltava erittäin herkkä NADH:ille. NADH:in hapettuminen pinnoittamattomalla elektrodilla tarvitsee korkean ylijännitteen. Muokkaamattomat elektrodit kärsivät usein kuitenkin hapettumistuotteiden adsorptiosta elektrodin pinnalle. Ylijännitettä voidaan kuitenkin laskea ja likaantumista ehkäistä käyttämällä redox-mediaattoreita, jotka edistävät elektroninsiirtoa. Hiilinanoputkiin perustuvien elektrodien tiedetään voivan pienentää ylijännitettä NADH:in hapettumiselle, mutta se ei riitä vielä NADH:in selektiiviselle mittaamiselle. Olisi tärkeää kehittää elektrodi, joka pystyy katalysoimaan NADH:in hapettumisen negatiivisemmalla jännitteellä ($<0,1\text{ V}$), jotta helposti hapettuvat häiriöaineet, kuten askorbiinihappo ja virtsahappo eivät hapettuisi myös ja vaikuttaisi mittaustulokseen. Redox-mediaattoreiden käyttö hiilinanoputkien kanssa voisi alentaa käytettävän jännitteen sopivalle tasolle NADH:in selektiiviseen mittaamiseen. (Chakraborty & Raj 2007)

Wassum et al. rakensivat platinasta mikroelektrodimatriisin piikiekon päälle. Sen lisäksi platinan päälle laitettiin PPy-kerros, Nafion-kerros ja GluOx:ia. Elektrodilla tutkittiin amperometrialla glutamaatin mittausta *in vivo*. Glutamaatin mittaamisen herkkyydeksi saatiin $2,46 \pm 0,48\text{ pA}/\mu\text{M}$ ja havaitsemisrajaksi $0,79 \pm 0,16\text{ }\mu\text{M}$. Mittausvasteen nopeus oli $0,8 \pm 0,2\text{ s}$ PPy/Nafion/GluOx -pinnan läpi (tällöin mittaus saavutti 90 % maksimivirrasta glutamaatin lisäyksen jälkeen). $250\text{ }\mu\text{M}$ askorbiinihapon ja $20\text{ }\mu\text{M}$ dopamiinin vaikutukset saatiin suljettua pois tehokkaasti. PPy:n ja Nafionin yhdistämisen pinnoitteessa todettiin olevan hyvä ratkaisu selektiiviselle elektrodille ilman että sen vasteaika kärsii. (Wassum et al. 2008)

Amperometrialla on tutkittu askorbaatin ja uraatin vaikutusta mittauksiin, jossa elektrodin pinnalle oli kiinnitetty Nafionia ja glutamaattioksidaasia. Nafion-kerros parantaa selektiivisyyttä glutamaatille, kun mittaus perustuu vetyperoksidin havaitsemiseen anturilla. Nafion estää anionisten aineiden pääsyn elektrodin pinnalle, mutta kationinen vetyperoksidi pääsee kulkeutumaan sen läpi. Tutkimuksessa selvitettiin miten askorbaatti ja uraatti vaikuttavat mittaukseen, jos niiden konsentraatio liuoksessa on yhtä suuri kuin glutamaatin konsentraatio. Tulokset pelkästä glutamaattiliuoksesta olivat täysin samanlaisia kuin glutamaatti- ja askorbaattiliuoksesta tai glutamaatti- ja uraattiliuoksesta. Askorbaattikonsentraation huomattiin alkavan vaikuttaa saatuun vasteeseen, kun se oli kymmenkertainen verrattuna glutamaattikonsentraatioon. (Pan & Arnold 1996)

Gamma-aminovoihappo

GABA:lla ei ole kokonaisvarausta ja se on sähköisesti inaktiivinen (ks. kappale 3.2). Lisäksi sen pitoisuus solunulkoisessa nesteessä on vain 0,080 - 0,450 μM . Sitä muodostuu glutamaatin dekarboksyloitessa, ja siksi GABA:n konsentraation tasapainotila määritelläänkin GABA:n tuotannon ja poistamisen sekä glutamaatin poistamisen ja tuotannon jatkuvalla tasapainottelulla. (Tsukatani & Matsumoto 2005) GABA:n ja glutamaatin yhtäaikainen mittaus on siis tärkeää niiden todellisten konsentraatioiden selvittämiseksi.

GABA:a voidaan mitata anturilla, joka perustuu GABA-transaminaasi -entsyymiin (engl. *y-aminobutyric acid transaminase*, GABA-T) ja meripihkasemialdehydidehydrogenaasi-entsyymiin (engl. *succinic semialdehyde dehydrogenase*, SSDH). Näitä entsyymejä kutsutaan yleensä yhteisellä nimellä "GABASE". Näiden entsyymien käyttö perustuu GABA:n hajottamiseen ja hajoamistuote nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) pelkistyneen (NADPH) muodon mittaamiseen. NADPH:ia mittaamalla voidaan edelleen selvittää GABA:n pitoisuus. (Mazzei et al. 1996)

GABA-elektrodeja ei ole tutkittu yhtä paljon kuin aiemmin mainittuja glutamaattiantureita. Kuitenkin nanoluokan havaitsemisrajoihin on päästy. Sekioka et al. valmistivat sähkökemiallisesti elektroni-syklotroni-resonanssilla (engl. *electron cyclotron resonance*, ECR) esikäsitellyn hiilielektrodin GABA:n mittaamiseen. Anturi valmistettiin ECR-muokatusta hiilielektrodista, johon kiinnitettiin GABASE:a ja naudan veriseerumivalkuaista (engl. *bovine serum albumin*). Esikäsitely ECR:lla tasasi elektrodin vastetta NADPH:lle, sillä se esti pinnan likaantumista. ECR-muokkaus siis lisäsi happea elektrodin pinnalla, täten pinta oli hydrofiilisempi ja se vähensi hapettunutta NADPH:ia (NADP^+) likaamasta pintaa. NADPH:ille saatiin alimmaksi havaitsemisrajaksi 10 nM, joka oli huomattavasti parempi kuin käsittelemättömällä lasihiilielektrodilla saavutettu 250 nM. GABA:n havaitsemisrajaksi saatiin 30 nM muokkaamalla ECR-muokattua elektrodia GABASE:lla. Elektrodin todettiin omaavan matalamman havaitsemisrajan (30 nM) kuin aiemmin julkaistut tutkimukset GABA-antureista. (Sekioka et al. 2008)

Dopamiini

Dopamiini on positiivisesti varautunut ja sähköisesti aktiivinen. Sitä esiintyy solunulkoisessa nesteessä normaalisti vain noin 0.001 - 0.05 μM , ja sen vähäinen esiintyvyys onkin suuri haaste sen mittaamiselle. Mittaushaasteena on erityisesti askorbaatin vasteen erottaminen tai poisto, sillä sitä esiintyy solunulkoisessa nesteessä 10 000 -kertaisena konsentraationa verrattuna dopamiiniin. (Church & Justice 1987, Wightman et al. 1988)

Dopamiini on positiivisesti varautunut fysiologisessa pH:ssa ja täten se voi kerääntyä Nafionilla pinnoitetulle elektrodille. Askorbaatti on anioni tässä pH:ssa ja siksi Nafion hylkii sitä, johtaen noin 200-kertaiseen suurempaan herkkyyteen dopamiinille verrattuna askorbaattiin. Dopamiini voi myös läpäistä ohuen Nafion-pinnoitekerroksen kalvon läpi alle sekunnissa. (Wightman et al. 1988) Tästä syystä Nafionia on tutkittu paljon pinnoitemateriaalina nimenomaan dopamiinin mittaukseen (Chauhan & Pandey 2009,

Chen et al. 2009, Chen et al. 2010, Kumar et al. 2010, Lai et al. 2008, Prabakar & Narayanan 2009, Shahrokhian & Zare-Mahrdi 2007, Xiang-Qin et al. 2008). Tässä kappaleessa esitellään tarkemmin vain mataliin havaitsemisrajoihin päässeitä tuloksia.

Matalimpaan havaitsemisrajaan dopamiinille päästiin, kun käytettiin lasihiilielektrodia, jota oli muokattu boorilla seostetuilla hiilinanoputkilla. Havaitsemisrajaksi saatiin 1,4 nM. Elektroodin toimintaa testattiin myös askorbaatin häiriön alaisena. (Deng et al. 2009)

Dopamiinin mittauksessa hyviin havaitsemisrajoihin on päästy myös lasihiilielektrodilla, jota muokattiin poly(3-metyylitiofeeni):llä ja pinnoitettiin Nafionilla ja SWCNT:eilla. Hiilinanoputkien tasainen jakautumien pinnalle myös varmistettiin SECM-kuvilla (engl. *scanning electrochemical microscopy*). Dopamiinin havaitsemisraja tällä elektrodilla oli 5,0 nm. Lisäksi tutkittiin askorbaatin ja virtsahapon vaikutuksia mittaukseen. Kun liuoksessa oli samaan aikaan samat konsentraatiot dopamiinia, askorbaattia ja virtsahappoa, oli elektroodin vaste dopamiinille selvästi suurempi. Askorbaatti ja virtsahappo eivät häirinneet dopamiinin mittausta 100 syklin jälkeenkään juuri ollenkaan. Elektroodin säilyvyyttä tutkittiin myös, ja todettiin että kahdessa viikossa sen vaste laski 15 %. (Wang et al. 2006)

Noradrenaliini

Myös noradrenaliini on positiivisesti varautunut ja sähköisesti aktiivinen. Noradrenaliinin sähkökemiallista mittausta vaikeuttaa kuitenkin kaksi ongelmaa. Sen sähkökemiallisen palautumattomuuden takia se adsorboituu elektroodin pinnalle sähkökemiallisen hapettumisen jälkeen, mikä johtaa laajaan ylijännitteeseen. Toinen ongelma on, että askorbiinihappo häiritsee sen selektiivistä mittausta, sillä niiden hapettumisjännitteet ovat hyvin lähellä toisiaan. Noradrenaliinia on kyllä pystytty mittaamaan muokatuilla elektrodeilla, jolloin askorbiinihapon vaikutusta mittaukseen on saatu minimoitua. Mutta halvat ja tehokkaat ratkaisut sen mittaamiseen puuttuvat edelleen. (Zhang et al. 2009)

Elektroditutkimuksissa on valmistettu toimivia elektrodeja, mutta useimpien havaitsemisraja ei kuitenkaan riitä aineen mittaamiseen, koska noradrenaliinia esiintyy solunulkoisessa nesteessä vain 0.001 - 0.05 μM . Havaitsemisrajan tulisi siis olla noin 1 nM. Matalimpaan havaitsemisrajaan on päästy, kun on valmistettu poly-CCA (engl. *calconcarboxylic acid*) -muokattu lasihiilielektrodi noradrenaliinin, askorbiinihapon ja virtsahapon havaitsemiseksi. Elektroodin todettiin helpottavan aineiden hapettumista, mutta myös erottelevan päällekkäin menevien aineiden hapettumisjännitteet. DPV:lla saatiin vasteena aineille kolme erillistä piikkiä, joista voitiin laskea kunkin konsentraatio liuoksessa. Noradrenaliinin havaitsemisrajaksi saatiin 10 nM. Eli elektroodin todettiin pystyvän havaitsemaan selektiivisesti ja pieniäkin konsentraatioita kaikista kolmesta aineesta yhdessä tai erikseen. (Liu et al. 2008) Tämä havaitsemisraja jää kuitenkin vielä kauas toivotusta 1 nM rajasta.

Park et al. valmistivat noradrenaliini-anturin kiinnittämällä boorilla seostetun ohuen timanttifilmin platinalangan päälle. Vasteen vakaus, elektroodin likaantumattomuus ja matala taustavirta olivat tämän elektroodin parhaita puolia. Elektroodin vaste pysyi hyvin vakaana rotan kudoksessa 7 tunnin ajan, sillä se vaimeni vain alle 8 %. Samassa

tilanteessa pinnoittamattomalla hiilikuidulla vaste vaimeni yli 30 %. Pinnoitetun elektrodin vakaus johtui biomolekyylien heikosta adsorptiosta timantin pinnalle, eli se ei likaantunut merkittävästi. Anturin havaitsemisrajaksi saatiin 10 nM. (Park et al. 2006) Havaitsemisrajassa on parannettavaa, ennen kuin sillä voidaan mitata tarkasti pieniä noradrenaliinipitoisuuksia. Seitsemän tunnin vakaa vaste ei myöskään riitä kroonisiin mittauksiin.

Serotoniini

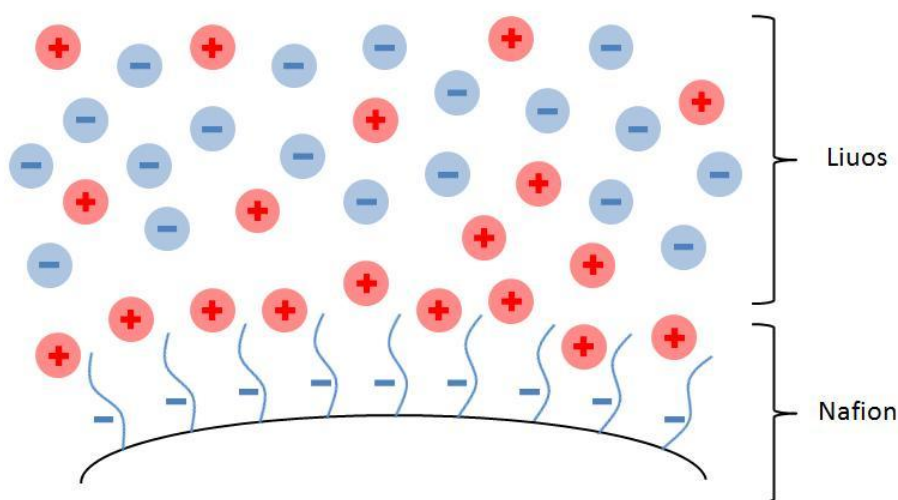
Serotoniinikin on positiivisesti varautunut ja sähköisesti aktiivinen. Serotoniinia esiintyy solunulkoisessa nesteessä vain 0.001 - 0.01 μM , joten sen havaitseminen vaatii 1 nM havaitsemisrajan elektrodille. Se on kemiallisesti palautumaton aine, eli se adsorboituu elektrodin pinnalle sähkökemiallisen hapettumisen jälkeen. Adsorboituminen muodostaa ongelman erityisesti kun halutaan mitata serotoniinia pitkäaikaisesti. Ongelman ratkaisemiseksi on kehitettävä uusia elektrodimateriaaleja, jotka estävät adsorptiota ja kuitenkin samalla ovat hyvin herkkiä. (Inokuchi et al. 2011)

Boorilla seostetuilla timanttielektrodeilla on joitakin parempia ominaisuuksia, kuin metalli- ja hiilielektrodeilla: matala ja vakaa taustasignaali, laaja jänniteikkuna, erinomainen mikrorakenteen vakaus, hyvä aktiivisuus ilman tavanomaisia esikäsitteilyjä ja likaantumisen esto. Viime vuosina tutkimuksissa on huomattu, että timanttielektrodit sopivat hyvin serotoniinin (Patel et al. 2007) reaali-aikaiseen mittaamiseen *in vitro*. (Zhao et al. 2010) Paljon lisätutkimusta tarvitaan, jotta elektrodi sopisi myös *in vivo* -mittauksiin.

Inokuchi et al. valmistivat levyelektrodi-matriisiin nanohiilifilmistä, tutkiakseen sen vakautta serotoniinin jatkuvassa mittauksessa. Nanohiilifilmielektrodia verrattiin vastaavaan kultaelektrodiin. Elektrodin virtatiheyden on oltava mahdollisimman pieni, koska suuri virrantiheys aiheuttaa analyytin adsorptoitumista. Tällä on merkitystä erityisesti elektrodin pitkäaikaisessa käytössä. Huomattiin, että serotoniinin adsorptio elektrodille 10 syklin jälkeen laski hiilielektrodin jännitetiheyttä vain 2 %, samalla kuin kultaelektrodilla se laski 30 %. Hiilielektrodi vähensi siis merkittävästi serotoniinin adsorptiota verrattuna kultaelektrodiin. (Inokuchi et al. 2011)

4.2.2 Nafion-pinnoite

Nafion[®] (E. I. du Pont de Nemours and Company:n rekisteröity tavaramerkki) on perfluorinoitu kationinvaihtopolymeeri. Kationinvaihtopolymeerit ovat negatiivisesti varautuneita, jolloin ne vetävät puoleensa positiivisesti varautuneita ioneja (Farlex et al. 2011). Nafion-pinnoitteen sulfonaattiryhmät vetävät puoleensa kationeja (positiivisesti varautunut ioni) ja hylkivät anioneja (negatiivisesti varautunut ioni). Kationit diffundoituvat Nafion-kerroksen läpi elektrodin varsinaiselle mittausalueelle. Näin ollen kationit voidaan erotella Nafionin avulla ympäröivästä liuoksesta. Kuvassa 16 havainnollistetaan tätä toimintaperiaatetta. Nafionia käytetään laajalti elektrodipinnoitteena erityisesti katekoliamiinien havaitsemiseen, koska biogeeniset (eli eloperäiset) amiinit ovat positiivisesti varautuneita fysiologisessa pH-arvossa. (Robinson et al. 2008)



Kuva 16. Nafionin toimintaperiaate. Punaiset pallot ovat positiivisesti ja siniset pallot negatiivisesti varautuneita ioneja. Siniset viivat Nafionin pinnalla kuvaavat negatiivisesti varautuneita sulfonaattiryhmiä.

Elektrodin pinnoittaminen nestemäisellä Nafionilla voidaan tehdä kahdella eri tavalla:

1. upottamalla tai kastamalla elektrodin pää liuokseen (engl. *dip-coating*) (Burmeister & Gerhardt 2001, Chou et al. 2009, Davis et al. 1995, Kulagina et al. 1999, Vaidya et al. 1995, Xiang-Qin et al. 2008) tai
2. asettamalla neste elektrodille (engl. *drop coating*) (Chauhan & Pandey 2009, Chen et al. 2009, Huong et al. 2009, Kumar et al. 2010, Pan & Arnold 1996, Prabakar & Narayanan 2009).

Tämän jälkeen liuottimen annetaan haihtua elektrodin pinnalta, ja jäljelle jää Nafion-pinnoite. (Robinson et al. 2008) Kumpaakin pinnoittamistapaa on käytetty monissa tutkimuksissa eri variaatioina, mutta perusteluja toisen tavan valitsemiselle ei ole esitetty. Pinnoittamista on kokeiltu eri vahvuisilla liuoksilla. Yleisimmin on käytetty 5 % -liuosta (Burmeister et al. 2000, Chang et al. 2007, Gerhardt & Hoffman 2001), mutta liuoksia on testattu myös laimeasta 1 % -liuoksesta (Prabakar & Narayanan 2009, Schuvailo et al. 2006) vahvaan 8 % -liuokseen (White et al. 1982). Vaihtelua on ollut myös upottamisajassa tai elektrodille asetetun nesteen määrässä. Upottamisaika on vaihdellut yhdestä sekunnista (Xiang-Qin et al. 2008) 60 minuuttiin (Vaidya et al. 1995). Asetetun nesteen määrä puolestaan on vaihdellut 0,5 µl (Chang et al. 2007) ja 10 µl (Pan & Arnold 1996, White et al. 1982) välillä. Kuivumisajat ovat olleet 3 minuutin (Burmeister et al. 2002) ja 4 tunnin (Lai et al. 2008) väliltä. Lyhyempiä kuivumisaikoja on käytetty, kun pinnoite on kuivatettu uunissa 85 - 200 °C lämpötilassa (Burmeister et al. 2000, Burmeister et al. 2003b, Gerhardt & Hoffman 2001). Pidempiä kuivumisaikoja on käytetty, kun kuivatus on tehty 25 °C lämpötilassa (Lai et al. 2008). Lisäksi pinnoitteita on tehty yhdellä (Burmeister et al. 2003b, Chang et al. 2007) tai useammalla (Karyakin et al. 2000, Schuvailo et al. 2006, Wassum et al. 2008) upotuksella tai elektrodille asettamisella.

Nafion-pinnoitetta on tutkittu paljon viimeisten 20 vuoden aikana. Sen on todettu parantavan elektrodin selektiivisyyttä estämällä askorbiinihapon ja virtsahapon pääsyä elektrodille ja lisäämällä elektrodin herkkyyttä dopamiinille (Davis et al. 1995, Hulthe

et al. 1987, Pan & Arnold 1996). Nafion-kerros on myös voimakkaasti hydrofobinen, ja siksi se vähentää pinnan likaantumista (Robinson et al. 2008). Kerroksen paksuudella on huomattu olevan vaikutusta elektrodin selektiivisyyteen (Pan & Arnold 1996) ja mittauksen vasteaikaan. Nafion alentaa elektrodin johtavuutta, jolloin kationit diffundoituvat hitaammin mittausalueelle kuin ilman Nafionia. Koko järjestelmän vasteaika siis kasvaa, eikä nopeita konsentraatiomuutoksia voida havaita. Tämä on Nafionin merkittävin ongelma bioanturisoivellusten kannalta. (Baur et al. 1988, Chou et al. 2009, Patel et al. 2007, Wightman et al. 1988) Nafionia tutkitaan kuitenkin edelleen aktiivisesti välittäjäaineiden mittaamiseen käytettävien elektrodien pinnoitteena (Li et al. 2007, Norouzi et al. 2010, Sattarahmady et al. 2010), joten sen mahdollisuuksiin osana elektrodia uskotaan.

Vaidya et al. käyttivät elektrodina platinalankaa, jonka halkaisija oli 0,25 mm. Amperometrisiä mittauksia tehtiin sekä pinnoittamattomalla, että Nafionilla päällystetyllä platinalangalla. Platinaelektrodi upotettiin Nafion-liuokseen eripituisiksi ajoiksi: 0, 15, 30 ja 60 minuutiksi. Tuloksista huomattiin, että elektrodin päällystäminen Nafionilla poisti suuren osan askorbiinihapon, uraatin ja vetyperoksidin aiheuttamista häiriöistä. Askorbiinihapon ja uraatin tapauksessa päällystysajalla ei ollut suurta merkitystä, sillä 15 minuuttia riitti poistamaan jo suurimman osan häiriöstä. Tämän jälkeen niiden aiheuttama häiriösignaali oli enää noin 10 % verrattuna pinnoittamattomalla platinaelektrodilla mitattuun häiriöön. Sen sijaan vetyperoksidin tapauksessa pitkällä kuivumisajalla oli enemmän väliä: 30 minuuttiin asti häiriön poisto väheni vain vähän, mutta 60 minuutin upotusajalla häiriönpoisto oli paljon tehokkaampaa. Sekään ei tosin riittänyt yhtä hyvään häiriönpoistoon kuin askorbiinihapon ja uraatin tapauksessa. (Vaidya et al. 1995)

Harrison et al. valmistivat platinalangasta elektrodin, joka päällystettiin glukosioksidaasilla ja Nafionilla. Parhain Nafion-kerros saatiin aikaan ensin kastamalla elektrodi 0,5 % Nafion-liuokseen muutamia kertoja, ja tämän jälkeen vasta kastamalla muutaman kerran 1 % tai 5 % Nafion-liuokseen. Kastamisten välissä elektrodin annettiin kuivua vähintään 1 tunnin ajan. Tämä tapa sai aikaan paljon aktiivisempia elektrodeja kuin suoraan 5 % liuokseen kastetut, jolloin entsyymien aktiivisuus väheni huomattavasti. Syy tälle ei ollut selvä, mutta uskottiin, että korkeampi protoniaktiivisuus 5 % -liuoksessa denaturoi osittain entsyymin, silloin kun siinä ei ole välissä suojaavaa Nafion-kerrosta. (Harrison et al. 1988)

Vaikka Nafionia on käytetty pinnoitteena useissa tutkimuksissa, ei pinnoitteen paksuutta tai tasaisuutta ole selvitetty useimmissa niistä. Kolmessa tutkimuksessa on esitetty Nafion-kerroksen paksuudet. Pan et al. valmistivat elektrodin asettamalla Nafion-liuoksen platinaelektrodille. Nafionin lisäksi pinnalle lisättiin glutamaattioksidaasia. Nafionin mitatut paksuudet vaihtelivat 2,2 ja 11 µm välillä. Tutkimuksessa todettiin 6,7 µm paksuuden riittävän poistamaan askorbiinihapon aiheuttamia häiriöitä 95 %:sesti. (Pan & Arnold 1996) Chou et al. mittasivat Nafion-kerroksen paksuutta pyyhkäisyelektronimikroskooppilla (engl. *scanning electron microscope*, SEM). 10 sekunnin upotuksella 5 % liuokseen tehdyn pinnoitteen paksuudeksi saatiin 2 - 3 µm. Elektrodi oli lasihiilestä valmistettu levyelektrodi. (Chou et al. 2009) Huong et al.

tutkivat Nafionin eri määrien asettamista lasihiilielektrodille. Valmistetut pinnat olivat 0,8 - 6,2 μm paksuisia. Tutkimuksessa valittiin käytettäväksi 3,5 μm paksuinen kerros, jotta se ei olisi liian paksu dopamiinin havaitsemiseksi, eikä liian ohut askorbiinihapon häiriön poistamiseksi. (Huong et al. 2009)

5 Tutkimusmenetelmät

Tämän diplomityön kokeissa selvitettiin pinnoittamattomien ja Nafionilla pinnoitettujen platinaelektrodien eroja, kun mitattiin dopamiinia ja häiriöaineena askorbiinihappoa syklisellä voltammetrialla fosfaatti-puskuroidussa suolaliuoksessa. Lisäksi pinnoitettuja näytteitä kuvattiin pyyhkäisyelektronimikroskoopilla pinnoitteiden paksuuden selvittämiseksi. Kokeita tehtiin kahdessa osassa. Ensimmäisillä elektrodeilla tehdyt mittaukset autoivat mittausparametrien valinnassa. Toisen erän elektrodeilla tehtiin varsinaiset tässä työssä esiteltävät tulokset.

5.1 Elektrodien valmistus

Tässä kappaleessa esitellään elektrodien valmistaminen platinalangasta ja Nafion-polymeeripinnoitteesta. Ensimmäisen ja toisen erän elektrodien pinnoitusmenetelmä ja elektrodien rakentamisen järjestys olivat erilaisia. Ensimmäisillä elektrodeilla tehdyt mittaukset autoivat toisen erän elektrodien valmistamisessa.

Kokeissa käytetyt elektrodit valmistettiin platina-iridiumlangasta (Pt 90 ja Ir 10 painoprosenttia), jonka halkaisija oli 0,38 mm. Platina valittiin elektrodimateriaaliksi, koska sen käytöstä elektroditutkimuksissa oli jo kokemusta Elektroniikan laitoksella. Kokeissa käytettävä Nafion® tilattiin Sigma-Aldrich -yhtiöltä (Nafion® 117 -liuos, ~5 %, seoksessa alempiarvoisia alifaattisia alkoholeja ja vettä). Nafionin kemiallinen kaava on $C_7HF_{13}O_5S \cdot C_2F_4$ (Mauritz & Moore 2004). Tässä työssä elektrodi pinnoitettiin upottamalla liuokseen (ks. kappale 4.2.2), sillä upotus soveltuu paremmin pyöreän platinalangan pinnoittamiseen kuin nesteen asettaminen. Nafion-pinnoitteita tehtiin kahdella eri vahvuisella liuoksella. Toisena liuoksena käytettiin valmista 5 % -liuosta, ja toinen liuos laimennettiin puoleen alkuperäisestä (eli 2,5 %).

5.1.1 Ensimmäisen erän elektrodit

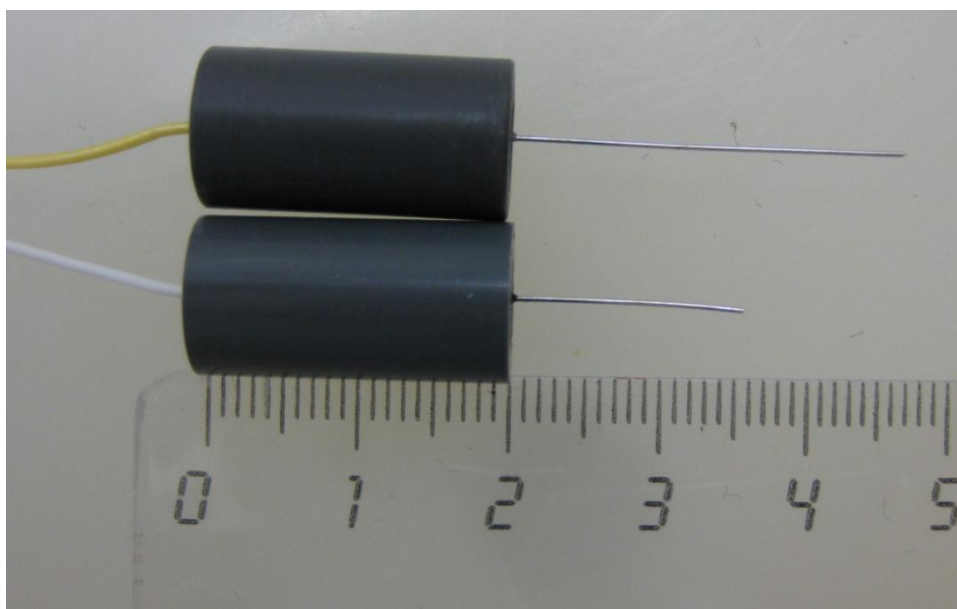
Platinalanganäytteitä tehtiin yhteensä 11 kappaletta: kolme pinnoittamatonta ja kahdeksan Nafionilla pinnoitettavaa. Kunkin platinalangan alkupituus oli 25 mm. Ensin platinalangat puhdistettiin pesemällä ne asetonissa (CH_3COCH_3) ja 65 % typpihapossa (HNO_3). Tämän jälkeen niitä kuivatettiin 600 °C lämpötilassa kuumailmapuhaltimella (Steinel HL1800E) ja hiottiin lasivillalla. Platinalangan muoto esti sen hiomisen aluminiumoksidi-tasohiontakalvolla, jota aiemmin on käytetty platinan hiomiseen (Pan & Arnold 1996, Vaidya et al. 1995).

Kahdeksasta pinnoitettavasta elektrodista neljä päällystettiin laimeammalla liuoksella ja toiset neljä vahvemmallalla. Laimennettu liuos tehtiin sekoittamalla 0,5 ml isopropanolia, 0,5 ml deionisoitua vettä (DI-vesi) ja 1 ml 5 % Nafion-liuosta. Kastaminen tehtiin 1,5 millilitran mikrosentrifugiputkessa, johon liuosta laitettiin noin 1,8 ml. Platinalankoja kastettiin mahdollisimman syväälle nesteeseen, niin että ainakin 1,5 cm pituinen alue pinnoittui. Tämä alue vastasi elektrodissa esille jäävää platinalangan osaa. Jokaista platinalankaa kastettiin liuokseen 5 sekunnin ajan. Nafion-liuokseen kastamisen jälkeen

platinalankojen annettiin kuivua huoneenlämmössä kolmen vuorokauden ajan. Tämän jälkeen ne juotettiin virtalankaan ja implantoitiin PVC-muoviputken sisään. Eristys tehtiin epoksilla, sillä se on yleisesti käytössä oleva eristysmateriaali hermostossa käytettävissä elektrodeissa (Robinson et al. 2008). Epoksi jätettiin kuivumaan noin 20 tunniksi.

5.1.2 Toisen erän elektrodit

Näytteitä tehtiin yhteensä 11 kappaletta: yksi pitkä vastaelektrodiksi ja 10 lyhyempää pinnoitettavaa työelektrodeiksi. Työelektrodeina käytettyjen platinalankojen alkupituus oli 25 mm, ja vastaelektrodina käytetyn langan pituus oli 35 mm. Ne puhdistettiin ensimmäisten elektrodien tapaan asetonilla, typpihapolla ja kuumalla ilmalla. Tämän jälkeen ne juotettiin tinalla virtajohtoon ja implantoitiin PVC-muovista valmistettuun sylinterinmuotoiseen muottiin. Johdon ja muovin välinen tila eristettiin epoksilla. Lopuksi elektrodit huuhdeltiin DI-vedellä ja jätettiin kuivumaan huoneenlämpötilaan 3 tunniksi. Kuvassa 17 on pitkä vastaelektrodi ylempänä ja sen alla pinnoittamaton työelektrodi.



Kuva 17. Vasta- ja työelektrodit, joissa oikealla oleva hopean värinen piikki on platinalankaa, tummanharmaa muovi on PVC-muovia ja keltaiset ja valkoiset langat virtalankoja.

Nämä platinalangat oltiin implantoitu PVC-muoviin jo ennen pinnoittamista, joten niistä päällystettiin vain näkyvissä oleva platinalangan osa. Kastaminen tehtiin isommassa astiassa kuin edellisille elektrodeille. Koska elektrodit olivat jo PVC-muovissa ja siksi siis isompia kooltaan, pinnoiteliuos tehtiin 15 ml:n muoviseen koeputkeen. Samalla kun elektrodit kastettiin liuokseen myös osa PVC-muovista pinnoittui. Jokaista elektrodia kastettiin liuokseen 5 sekunnin ajan, jonka jälkeen elektrodin annettiin kuivua 20 min. Tämä toistettiin 3 kertaa. Viidelle elektrodille käytettiin 5 % Nafion-liuosta, ja viidelle muulle 2,5 % -liuosta.

5.2 Sähkökemialliset mittaukset syklisellä voltammetrialla

Syklisessä voltammetriassa käytettiin Princeton Applied Researchin K0047 korroosiokennoa, eDAQin e-corder 821 -yksikköä ja QuadStat 164 -potentiostaattia. Signaalin keräykseen ja analysointiin käytettiin eDAQin EChem (vs. 2.1.5) -ohjelmistoa. Elektrodeja testattiin liuoksessa, joka vastasi olosuhteiltaan elimistön fysiologista ympäristöä. Kuvassa 18 on esitetty koejärjestely.



Kuva 18. Mittauksissa käytetty korroosiokenno lämpövesihauteessa. Kennossa on viisi aukkoa, joista neljää käytettiin kokeissa. Kuvassa ylimmäisenä näkyvä putki on typetysputki, sen alla kuvassa on vasemmalta oikealle vastaelektrodi, tyhjä aukko ja työelektrodi. Mustapäinen referenssielektrodi näkyy kuvassa alimpana.

Kokeissa käytettiin elektrolyyttiliuoksena fosfaatti-puskuroitua suolaliuosta (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS). Se on biologinen puskuriliuos, jota käytetään laajalti *in vitro* -kokeissa (Cogan 2008). PBS-liuos tehtiin sekoittamalla seuraavat aineet yksitellen 1 000 ml:an DI-vettä:

Kaliumkloridi KCl	0,20 g,
Natriumkloridi NaCl	8,00 g,
Dinatriumvetymonofosfaatti Na ₂ HPO ₄	1,44 g ja
Kaliumdivetyfosfaatti KH ₂ PO ₄	0,24 g.

Aineet punnittiin Precisa:n XT220A -vaa'alla, jonka tarkkuus on 0,0001 g. Yhden liuoksen pH-arvo tarkistettiin Metrohmin 744 pH Meter -laitteella. Tulokseksi saatiin pH 7,52, jonka todettiin olevan tarpeeksi lähellä tavoiteltua pH 7,4 arvoa.

Kokeissa käytettiin erilaisia PBS-liuoksia: neljään liuokseen lisättiin askorbaattia (AA) eri voimakkuuksina, kahteen liuokseen lisättiin dopamiinia (DA) eri voimakkuuksina ja kahteen liuokseen ei lisätty mitään. L-askorbiinihappo -jauhe (Bio Xtra, $\geq 99,0$ %) ja dopamiinihydrokloridi -jauhe tilattiin Sigma-Aldrichilta. AA:n kemiallinen kaava on $C_6H_8O_6$ ja sen moolimassa on 176,12 g/mol (Bolton et al. 2008). DA:n kemiallinen kaava on $C_8H_{11}NO_2$ ja sen moolimassa on 153,18 g/mol (Bolton, 2008). AA valittiin tutkittavaksi, koska se on yleinen häiriöaine välittäjäaineiden mittauksissa. DA puolestaan valittiin malliksi positiivisesti varautuneista ja sähköisesti aktiivisista välittäjäaineista.

AA-liuosten konsentraatioina käytettiin askorbaatin normaalikonsentraatioita (100 - 500 μ M). Tämän lisäksi kahdessa mittauksessa käytettiin suurempia konsentraatioita (700 μ M ja 1000 μ M), jotta voitiin testata saadaanko askorbaatin aiheuttama häiriö poistettua mittauksesta vaikka konsentraatio on suurempi kuin normaalisti. DA-liuosten konsentraatiot valittiin suuremmiksi normaaleista solunulkoisen nesteen konsentraatioista (0.001 - 0.05 μ M), koska muissa tutkimuksissa syklistä voltammetrialla ja Nafionilla pinnoitetuilla elektrodeilla tutkitut DA-pitoisuudet ovat olleet 10 (Wang et al. 2006) - 1 000 μ M (Shahrokhian & Zare-Mahrjardi 2007). Näitä konsentraatioita on siis pystytty havaitsemaan. DA:ia mitattiin 10 ja 500 μ M pitoisuuksilla. Toinen liuos tehtiin 500 μ M:n konsentraatiolla, jotta sillä ja 500 μ M:n AA-liuoksella saatuja voltammogrammeja voitiin verrata keskenään.

Aina kun kennon liuosta vaihdettiin, sitä tyytettiin 30 minuutin ajan ennen kuin elektrodit laitettiin paikoilleen ja mittaukset aloitettiin. Tyytystä jatkettiin myös kokeiden aikana. Liuosta tyyttämällä siitä saadaan poistettua O_2 -molekyylit. Kenno oli lämpövesihauteessa, jotta kennon liuoksen lämpötila olisi 37 °C. Lämpötilaa tarkkailtiin kaikkien mittausten aikana, ja se vaihteli 36,2 ja 39,5 °C välillä.

Työelektrodia vaihdeltiin eri mittauksissa. Sekä pinnoittamattomia, että pinnoitettuja elektrodeja käytettiin. Vastaelektrodia vaihdeltiin myös, mutta se oli aina pinnoittamaton platinaelektrodi. Referenssielektrodina oli kalomelielektrodi luggin-kapillaarilla kaikissa mittauksissa. Useissa voltammetriakokeissa on käytetty platinaelektrodia vastaelektrodina ja kalomelielektrodia referenssielektrodina (Cui et al. 2001, Cui & Martin 2003, Kim et al. 2004b, Lai et al. 2008, Prabakar & Narayanan 2009, Wang et al. 2006, Yang et al. 2005).

Käytetty jännitealue oli -0,6 V - 0,8 V jotta koe-olosuhteet vastaisivat mahdollisimman hyvin elimistön olosuhteita (Hudak et al. 2010). Pyyhkäisynopeutena käytettiin 50 mV/s (Cogan 2008). Ensimmäisten syklistä voltammetrialla tehtyjen mittausten avulla selvitettiin muita ohjelmistoon syötettäviä parametrejä ja elektrodien sijoittamista kennossa. Ohjelmiston manuaalin (Duckworth 1999) ja kuvien vertailun avulla valittiin parametrit ja elektrodien sijoittelu kennossa toisen erän elektrodien mittauksiin. Yhden syklin ajo yhdellä elektrodilla yhdessä liuoksessa kesti 56 sekuntia. Syklejä ajettiin useampia kullekin elektrodille kussakin liuoksessa.

5.2.1 Mittaukset ensimmäisen erän elektrodeilla

Ensimmäisistä elektrodeista kokeissa käytettiin työelektrodeina kahta pinnoitettua ja yhtä pinnoittamatonta sekä vastaelektrodeina kahta pinnoittamatonta. Pinnoitetuista toinen oli tehty laimeammalla ja toinen vahvemalla Nafion-liuoksella. Taulukossa 3 on elektrodien tunnuksot, joita käytetään tästä eteenpäin. Ensimmäisenä oleva numero 1 osoittaa, että kyseessä on ensimmäisen erän elektrodi. Seuraava kirjain kertoo onko elektrodi pinnoittamaton (A), 2,5 % -liuoksella pinnoitettu (B) tai 5 % -liuoksella pinnoitettu (C). Viimeinen kirjain osoittaa järjestysnumeron.

Taulukko 3. Ensimmäisen erän elektrodien tunnuksot.

Tunnus	Elektrodi
1A-1	pinnoittamaton, ensimmäinen
1A-2	pinnoittamaton, toinen
1A-3	pinnoittamaton, kolmas
1B	pinnoitettu 2,5 % -liuoksessa
1C	pinnoitettu 5 % -liuoksessa

Ensimmäisen erän elektrodeilla tehtyjen mittausten liuokset, elektrodit, elektrodien sijainnit ja parametri-valinnat on esitetty liitteessä 1. Niiden perusteella valittiin parametrit käytettäväksi toisen erän elektrodeilla. Ensimmäisen erän kaksi vastaelektrodia olivat pinta-alaltaan samankokoisia kuin työelektrodit.

5.2.2 Mittaukset toisen erän elektrodeilla

Toisen erän elektrodeista kokeissa käytettiin yhtä isoa pinnoittamatonta platinaelektrodia vastaelektrodina, sillä vastaelektrodin pinta-alan tulee olla suurempi kuin työelektrodin, jotta vastaelektrodi ei hidasta mittausta rajoittamalla virrankulkua (Merrill et al. 2005). Lisäksi käytettiin ensimmäisistä elektrodeista yhtä pinnoittamatonta platinaelektrodia työelektrodina (1A-1, ks. taulukko 3). Pinnoitetuista elektrodeista mittauksiin valittiin neljä pinnaltaan tasaisimman näköistä elektrodia. Osassa elektrodeja oli nähtävissä epätasaisuuksia platinalangan, epoksin ja PVC-muovin päällä. Pinnoitteessa oli nähtävissä kuhmuja, todennäköisesti johtuen Nafionin kasautumisesta. Koe-elektrodeiksi valittiin kappaleet, joissa ei ollut silminnähtäviä epätasaisuuksia platinalangan päällä. Taulukossa 4 on toisen erän elektrodien tunnuksot, joita käytetään tästä eteenpäin. Ne muodostuvat samalla tavoin kuin ensimmäisen erän elektrodien tunnuksot. Tunnuksien merkitys on kerrottu taulukon 3 yhteydessä.

Taulukko 4. Toisen erän elektrodien tunnuksot.

Tunnus	Elektrodi
1A-1	pinnoittamaton, ensimmäinen (ensimmäisestä elektrodierästä)
2A	pinnoittamaton, iso vastaelektrodi
2B-1	pinnoitettu 2,5 % -liuoksessa, ensimmäinen
2B-2	pinnoitettu 2,5 % -liuoksessa, toinen
2C-1	pinnoitettu 5 % -liuoksessa, ensimmäinen
2C-2	pinnoitettu 5 % -liuoksessa, toinen

Työ- ja vastaelektrodit olivat vastakkaisilla reunoilla kennossa, joten niiden etäisyys oli noin 11,5 cm. Referenssielektrodi oli elektrodien keskivälissä niin, että sen suu oli

mahdollisimman kohtisuoraan elektrodien välissä. Vastaelektrodi oli pinta-alaltaan suurempi kuin työelektrodit. Taulukossa 5 on esitetty eri mittauskertojen liuokset, käytetyt elektrodit ja ajetut syklit. Kaikissa mittauksissa käytettiin vastaelektrodina 2A-1 -elektrodia.

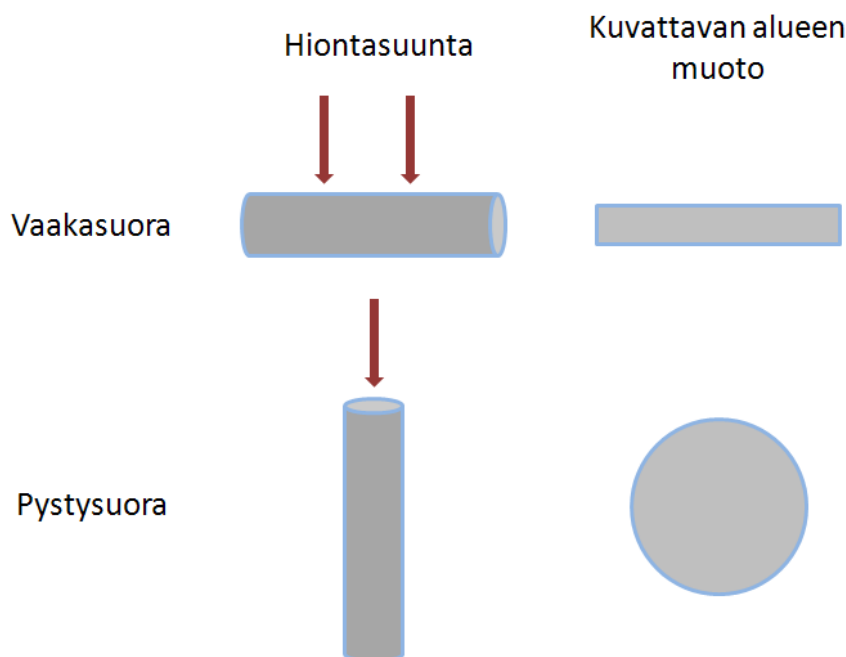
Taulukko 5. Mittauskertojen 1-6 liuokset, elektrodit ja ajetut syklit.

Mittaus- kerta	PBS-liuos (lisätyn aineen määrä / 900 ml)	Työelektrodi (syklien määrä)				
		1A-1	2B-1	2B-2	2C-1	2C-2
1	ei lisättyä	31	31	31	31	31
2	10 μ M DA (1,4 mg)	14	14	14	14	14
3	500 μ M DA (68,9 mg)	14	14	14	14	14
4	500 μ M AA (79,3 mg)	14	14	14	14	14
5	700 μ M AA (111,0 mg)	11	11	11	15	11
6	500 μ M AA (79,3 mg)	11	11	11	11	11

Ensin kukin työelektrodi kävi vuorollaan läpi 31 sykliä PBS-liuoksessa. Näin elektrodit saavuttivat stabiilin tilansa (Cui et al. 2001). Tämän jälkeen kaikille viidelle työelektrodille ajettiin vuorollaan 14 sykliä PBS + 10 μ M DA -liuoksessa. Kolmas ajo tehtiin PBS + 500 μ M DA -liuoksessa. Tämän jälkeen elektrodit olivat huoneenlämpötilassa käyttämättöminä 16 tuntia. Seuraavat kokeet samoilla elektrodeilla tehtiin ensin PBS + 500 μ M AA -liuoksessa. Kaikille työelektrodeille ajettiin 14 sykliä. Vasteista huomattiin, että elektrodit olisi pitänyt puhdistaa 31 syklillä uudestaan, koska vaste muuttui paljon näiden syklien aikana. Tämä liuos päätettiin uusiksi mittauksen lopuksi. Seuraava liuos oli PBS + 700 μ M AA. Tässä liuoksessa ajettiin 15 sykliä 2C-1 -elektrodille. Sen tuloksista huomattiin, että 7 syklin jälkeen vasteet olivat jo tasaantuneet, ja siksi muille elektrodeille ajettiin vain 11 sykliä. Lopuksi uusittiin PBS + 500 μ M AA -liuoksen kokeet, ja kaikille työelektrodeille ajettiin 11 sykliä.

5.3 Pinnoitteen paksuuden tutkiminen

Pinnoitteen paksuus haluttiin selvittää, jotta nähtiin oliko eri pinnoitusmenetelmillä eroa syntyneeseen pinnoitepaksuuteen ja jotta voitiin laskea arvioidut pinta-alat kokeissa käytetyille elektrodeille. Pinnoitteiden paksuudet selvitettiin pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Mikroskooppikuvausta varten näytteitä valmistettiin kahdella eri tavalla. Kuvassa 19 on havainnollistettu näytteiden valmistusta. Kuvat otettiin samasta suunnasta kuin mistä niitä hiottiin. Jatkossa näytteistä puhutaan joko vaaka- tai pystytason näytteinä. Kaikki SEM-kuvat otettiin kokeissa käyttämättömistä elektrodeista.



Kuva 19. Näytteiden valmistaminen pysty- ja vaakasuoran leikkauksen kuvaamista varten. Vaaleansininen reuna kuvattavassa alueessa kuvaa Nafion-pinnoitetta.

Ensimmäisen erän elektrodien SEM-kuvia varten neljä elektrodia pinnoitettiin kromilla ja upotettiin epoksiin. Kromi-pinnoitus tehtiin sputteroimalla. Elektrodit olivat vaakatasossa laitteessa ja ne päällystettiin kaksi kertaa noin 10 nm:n paksuisella kerroksella, jolloin kromikerroksen paksuudeksi tuli noin 20 nm. Elektrodeja käännettiin, jotta toinen puoli voitiin päällystää myös kahteen kertaan saman paksuisella kerroksella kromia. Tämän jälkeen elektrodit leikattiin kahteen osaan Nafionilla pinnoitetun alueen keskeltä, ja nämä neljä elektrodikappaletta upotettiin epoksiin. Yhtä näytettä varten käytettiin 7,5 ml epoksiliimaa (Struers EpoFix Resin) ja 1 ml epoksikovettajaa (Struers EpoFix Hardener). Näytteistä poistettiin vielä ilmakuplat vakuuissa, ja epoksi jätettiin kuivumaan noin 20 tunnin ajaksi.

Epoksipaloja hiottiin piikarbidipaperilla Struers LaboPol-21 -laitteella, jonka jälkeen näytteitä kiillotettiin Struers RotoPol-22 -laitteella. Kiillotuksen jälkeen näytteet päällystettiin sputterissa kromilla, ja tämän jälkeen ne kuvattiin JEOL:in JSM-6330F kenttäemissiopyyhkäisyelektronimikroskoopilla (engl. *field emission scanning electron microscope*).

Toisen erän elektrodien kuvat otettiin myös neljästä näytteestä. Näytteet valmistettiin samoin kuin ensimmäisen erän elektrodit, mutta ilman näytteen kromi-pinnoitusta ennen epoksiin valua. Kromipinnoite todettiin turhaksi, sillä Nafionin ja epoksin rajapinnan voi erottaa SEM-kuvista Nafionin sisältämän fluorin ansiosta.

6 Tulokset

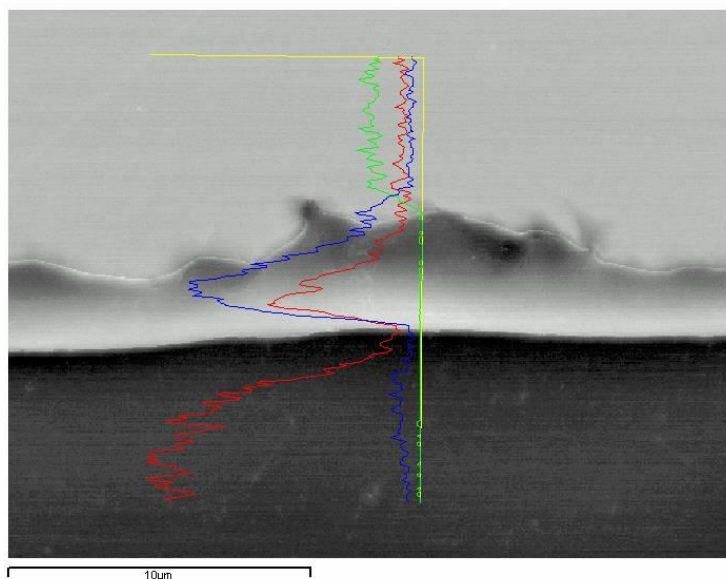
Tässä luvussa käydään ensin läpi SEM-kuvista mitatut arvot pinnoitteiden paksuudelle. Tämän jälkeen esitellään tulokset syklisellä voltammetrialla mitatuista liuksista eri elektrodeilla. Lopuksi tarkastellaan näitä tutkimustuloksia ja esitetään jatkotutkimuskohteita.

6.1 Pinnoitteen paksuus

SEM-kuvattuihin elektrodeihin viitataan jatkossa tunnuksin, jotka muodostuvat seuraavanlaisesti: 1 tarkoittaa ensimmäistä elektrodierää, B tai C laimeammalla tai vahvemmalli liuksella pinnoitettua näytettä ja vaaka tai pysty vaaka- tai pystytason näytettä. Kun kuvien yhteydessä puhutaan pinnoitteiden paksuuksista, vaakatazon näytteille on lisätty mitatun arvon perään arvioitu paksuus. Tämä johtuu siitä, että vaakatazon näytteitä oli hiottu liikaa ja niiden halkaisija kuvaamiskohdassa ei vastannut tunnettua halkaisijaa platinalangalle. Tämän vuoksi arvioidut paksuudet puolivälissä lankaa on laskettu kuvasta saatujen mittojen avulla. Näytteille tehtiin lisäksi alkuainekartoitus EDS-menetelmällä (engl. *energy-dispersive X-ray spectroscopy*), jotta nähtiin missä Nafion-kerroksen rajat ovat.

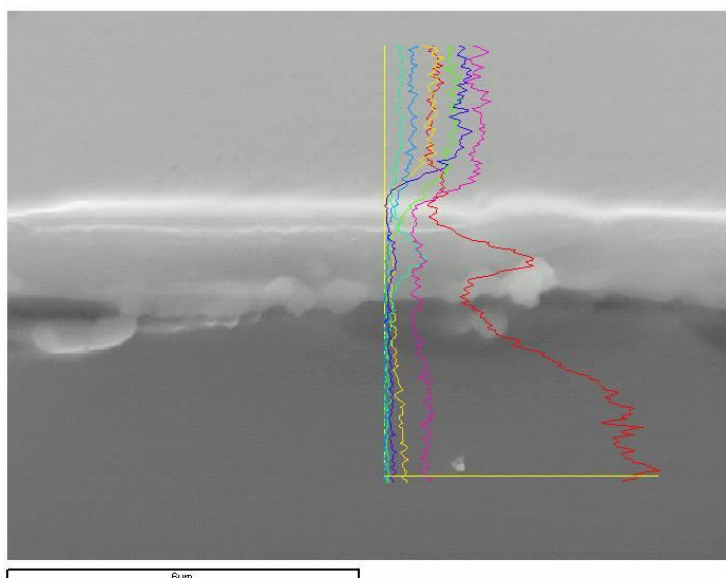
6.1.1 Ensimmäisen erän pinnoitteet

Kuvassa 20 on ensimmäisen erän vahvemmalli liuksella pinnoitettu platinalanka (1-C-vaaka). Käyrät on saatu kuvaan EDS-menetelmällä. Kuvasta nähdään, että epoksi näkyy kuvan alareunassa tummimpana alueena. SEM:alla voidaan erottaa eri aineet niiden kontrastin perusteella toisistaan. Sillä mitä pienempi järjestysluku aineella on, sitä tummempana se näkyy SEM:assa. Epoksin tummuus johtuu sen sisältämästä hiilestä, jonka järjestysluku on pienempi kuin platinan tai Nafionin sisältämän fluorin. Epoksin päällä on Nafion-kerros, jonka todistaa sinisen käyrän huippu sillä kohtaa. Sininen käyrä vastaa fluorin esiintyvyyttä aineessa, ja Nafion on ainoa näistä kolmesta aineesta joka sisältää fluoria. Ylimpänä oleva vaalein alue puolestaan on platina. Pinnoitekerroksen epätasaisuus johtuu joko platinan epätasaisesta pinnasta, tai Nafionin leviämisestä platinan päälle hionnan aikana. Nafionin ja epoksin välinen pinta on kuitenkin tasainen, joten elektrodin ulkopinta on muodostunut tasaisesti. Pinnoitteen paksuus tässä kuvassa on 2,2 - 4,0 μm (arvioitu 2,2 - 3,9 μm) riippuen mitattavasta kohdasta.



Kuva 20. 1-C-vaaka -elektrodin SEM-kuva ja alkuainekartoitus. Punainen käyrä kuvaa hiilen esiintymistä, sininen fluorin ja vaaleanvihreä platinan. Kuvassa merkitty mitta on 10 μm .

Kuvassa 21 on laimeammalla liuoksella päällystetty elektrodi (1-B-vaaka). Tässä kuvassa pinta vaikuttaa Nafionin molemmiin puolin tasaisemmalta kuin kuvan 20 elektrodissa. Nafionin esiintyvyyden tunnistaa vaaleansinisen piikin huipusta. Samassa kohdassa on myös hiilen toiseksi suurin huippu (punainen viiva). Tämän kerroksen paksuus on huomattavasti edellistä kuvaa 20 ohuempi. Se on vain 1,1 - 1,4 μm (arvioitu 1,0 - 1,3 μm). Huomaa, että kuvien mittakaavat eivät ole yhtenevät.



Kuva 21. 1-B-vaaka -elektrodin SEM-kuva ja alkuainekartoitus. Punainen käyrä kuvaa hiilen esiintymistä, vaaleansininen fluorin ja vaaleanvihreä platinan. Kuvassa merkitty mitta on 6 μm .

Ensimmäisten elektrodien SEM-kuvista näkyi, että pinnoite oli epätasainen varsinkin verratessa poikkileikkaus-kuvien ylä- ja alareunaa. 1-B-vaaka -elektrodi oli noin 1,2 μm (arvioitu 1,1 μm) paksu keskimäärin. 1-C-vaaka -elektrodi puolestaan oli 0,7 - 4,0 μm (arvioitu 0,7 - 3,9 μm) riippuen mistä kohdasta ja kummalta reunalta sitä mitattiin. Paksuudet vaihtelivat paljon yhden näytteen eri kohtia vertailemalla.

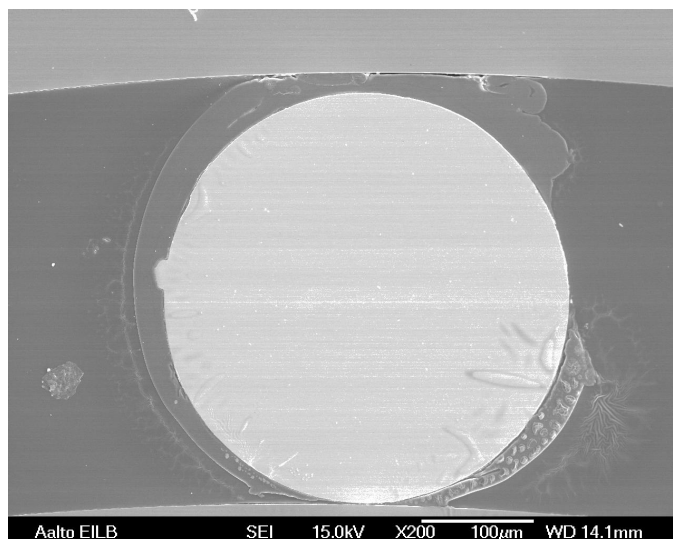
Taulukkoon 6 on kerätty SEM-kuvista saadut pinnoitepaksuudet. Paksuudet on esitetty kuvatululta kohdalta, josta saatiin myös näytteen halkaisijan mitta. Jotta arvioidut arvot voitiin laskea, täytyi selvittää kuinka paksuja muut ensimmäisen erän elektrodit olivat alkupuhdistusten jälkeen. Ensimmäisen erän pinnoittamattomien elektrodien halkaisijat olivat 379,0 (1A-1), 370,0 (1A-2) ja 380,0 (1A-3) μm , joten niiden keskiarvoksi saadaan 376,3 μm . Arvioitu paksuus pinnoitteille laskettiin paksuuden ja näytteen arvioidun halkaisijan avulla vastaamaan 376,3 μm halkaisijan kohdalta mitattua paksuutta.

Taulukko 6. Ensimmäisen erän näytteiden kuvista saadut pinnoitepaksuudet.

Näyte	Paksuus kuvassa (μm)	Näytteen halkaisija kuvassa (μm)	Arvioitu paksuus (μm)	Näytteen paksuuden keskiarvo (μm)
1-B-vaaka	1,1	347,4	1,0	1,1
	1,2		1,1	
	1,4		1,3	
1-C-vaaka	0,7	368,0	0,7	1,9
	0,8		0,8	
	0,9		0,9	
	2,2		2,2	
	3,0		3,0	
	4,0		3,9	

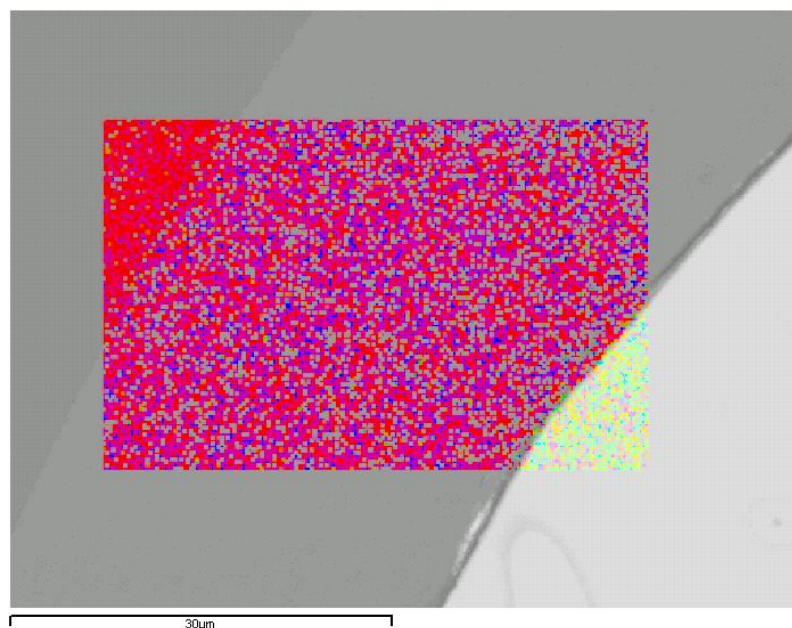
6.1.2 Toisen erän pinnoitteet

Toisen erän elektrodien SEM-kuvista voitiin huomata, että pinnoitteen paksuus samassa näytteessä vaihteli edelleen paljon. Kuvasta 22 nähdään, että näytteen yläreuna on selvästi paksummin pinnoittunut kuin alareuna. Yläreunan paksumman tasaisen ja vaurioitumattoman kohdan paksuus on 33,3 μm , ja alareunan ohuimman tasaisen ja vaurioitumattoman kohdan paksuus on 23,5 μm . Lisäksi pinnoite on kärsinyt näytteenpidikkeen puristuksesta (ks. kuvan 22 yläreuna). Oikeassa reunassa puolestaan näkyy, kuinka pinnoite on lohjennut. Pinnoitteen vaurioiden uskotaan johtuvan näytteenpidikkeestä. Näyttää, että yläreunan näytteenpidike on puristuksellaan saanut pinnoitteen liikkumaan oikealle päin. Tämä selittää oikeassa yläkulmassa näkyvän pinnoitteen epätasaisen muodon. Lisäksi puristus on saattanut aiheuttaa Nafion-palan lohkeamisen, kun se on jäänyt puristuksiin kummastakin suunnasta näytteenpidikkeen puristuksen aiheuttamaan liikkeeseen.



Kuva 22. SEM-kuva 2-C-pysty -elektrodin leikkauspinnasta. Keskellä on vaalea platinalangan pystyleikkaus, sen ympärillä Nafion-kerros, reunoilla epoksi ja ylä- ja alareunoissa näytteenpidike.

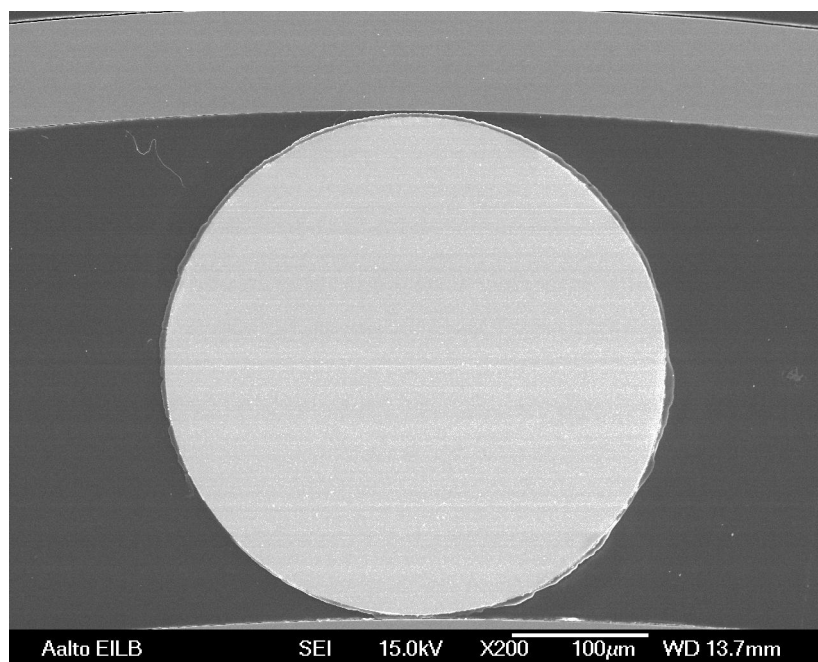
Kuvan 22 vasemmasta yläkulmasta tehtiin alkuainekartoitus, jotta voitiin todeta näkyvän kerroksen olevan Nafionia. Kuvassa 23 näkyy alkuainekartoituksen tulokset. Kuvaan on merkitty punaisella hiili, sinisellä fluori ja keltaisella platina. Kuvan avulla voidaan todeta selkeän raja-alueen epoksin ja platinan välillä olevan Nafionia. Paksuus tälle kerrokselle oli 33,3 μm.



Kuva 23. SEM-kuva ja alkuainekartoitus 2-C-pysty -elektrodin leikkauspinnasta. Punainen väri kuvaa hiiltä, sininen fluoria ja keltainen platinaa.

Kuvassa 24 on laimeammalla liuoksella pinnoitetun ja vastaavalla tavalla pystysuoraan kuvatun elektrodin SEM-kuva. Pinnoitteen paksuus vaihteli 2,6 ja 4,3 μm välillä, mutta vaihtelu ei ollut yhtä suurta kuin vahvemalla liuoksella valmistetussa näytteessä. Kuvasta voidaan nähdä, että pinnoite on huomattavasti ohuempi kuin vahvemman liuoksen pinnoitteessa (ks. kuva 22). Lisäksi pinnoite näyttää säilyneen hyvänä

näytteenpidikkeen puristuksesta huolimatta. Lohkeamia ei ollut havaittavissa tässä näytteessä.



Kuva 24. 2-B-pysty -elektrodin SEM-kuva. Keskellä on vaalea platinalangan pystyleikkaus, sen ympärillä Nafion-kerros, reunoilla epoksi ja ylä- ja alareunoissa näytteenpidike.

Kaksi muuta toisen erän elektrodia kuvattiin vaakasuoraan. Näiden elektrodien Nafion-kerrokset eivät näkyneet yhtä selvästi kuin pystysuoraan kuvattujen pinnoitteet. Vaakasuoraan kuvattujen pinnoitteiden huonon näkyvyyden lisäksi ei alkuainekartoitukseen löytänyt pinnoitteille selkeitä rajoja. 2-C-vaaka -elektrodin paksuudeksi mitattiin kuitenkin 3,2 - 3,8 μm (arvioitu 2,0 - 2,4 μm). Ero oli siis huomattava samalla tavoin pinnoitettujen elektrodien vaakasuoralla ja pystysuoralla (23,5 - 33,3 μm) kuvalla saataviin mittoihin. 2-B-vaaka -elektrodin paksuus puolestaan oli 1,0 - 1,9 μm (arvioitu 0,6 - 1,2 μm), ja sekin erosi paljon pystysuorasta kuvasta saaduista mitoista 2,6 - 4,3 μm .

Taulukkoon 7 on kerätty kuvista mitatut toisen erän elektrodien paksuudet. Paksuudet on esitetty kuvatulta kohdalta, josta saatiin myös näytteen halkaisijan mitta. Toisen erän pinnoittamattoman elektrodin (2A) paksuus oli 377,0 μm , joten se oli kaventunut 3 μm langan puhdistuksen yhteydessä hionnassa (ks. kappale 5.1). Arvioitu paksuus vaakasuoraan kuvatuille pinnoitteille laskettiin paksuuden ja näytteen halkaisijan avulla vastaamaan 377,0 μm halkaisijan kohdalta mitattua paksuutta.

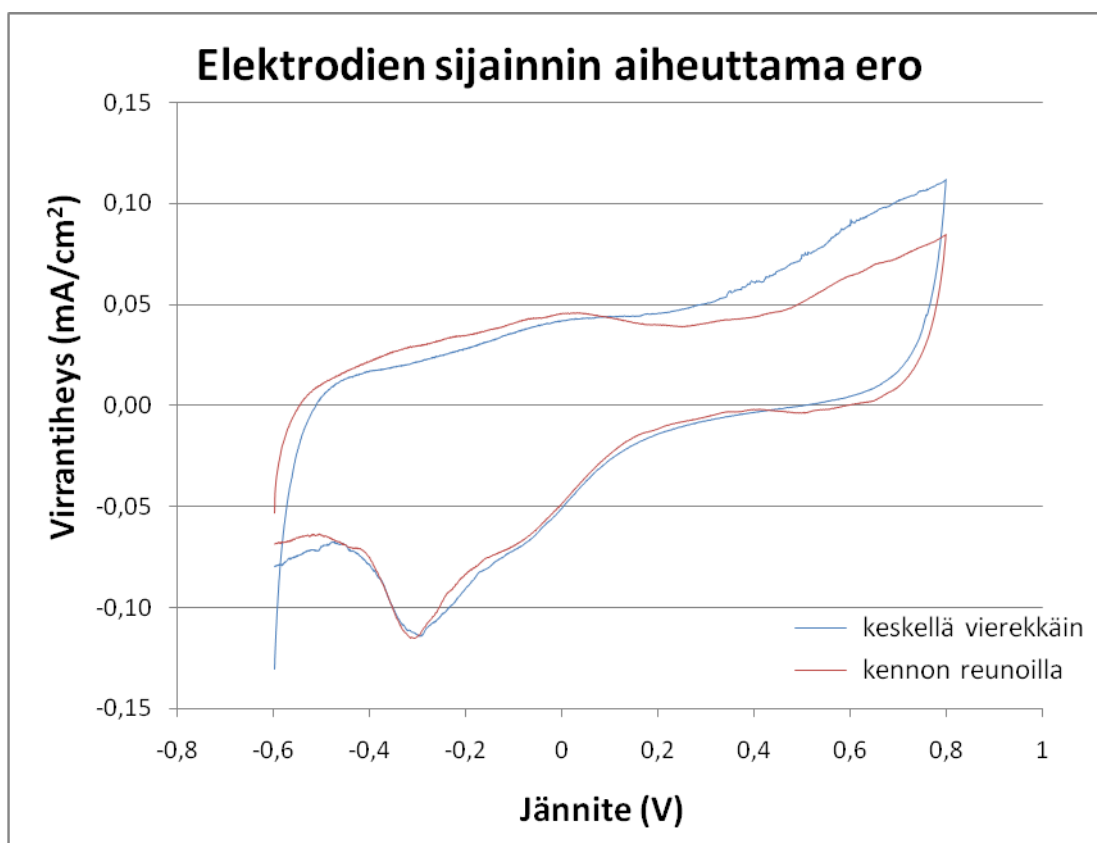
Taulukko 7. Toisen erän näytteiden kuvista saadut pinnoitepaksuudet.

Näyte	Paksuus kuvassa (µm)	Näytteen halkaisija kuvassa (µm)	Arvioitu paksuus (µm)	Näytteen paksuuden keskiarvo (µm)
2-B-vaaka	1,0	240,0	0,6	0,9
	1,1		0,7	
	1,2		0,8	
	1,5		1,0	
	1,7		1,1	
	1,9		1,2	
2-B-pysty	2,6	-	-	3,3
	3,0		-	
	4,3		-	
2-C-vaaka	3,2	234,0	2,0	2,2
	3,3		2,1	
	3,3		2,1	
	3,4		2,1	
	3,8		2,4	
	3,8		2,4	
2-C-pysty	23,5	-	-	28,4
	28,3		-	
	33,3		-	

Jotta kappaleeseen 6.2 saatiin tarvittavat virrantiheys-kuvaajat, täytyi elektrodien pinta-alat laskea ja sitä varten paksuudet arvioida. Tätä varten laimeamman liuoksen aikaansaaman paksuuden arvioitiin saatujen tulosten perusteella olevan 1,0 µm ja vahvemmallalla liuoksella pinnoitettujen 2,0 µm. Arviot tehtiin vaakasuoraan kuvattujen näytteiden paksuuksien perusteella, sillä niistä saatuja mittoja pidettiin luotettavampina, koska pintaa nähtiin suuremmalta alueelta. Pinta-alojen laskennat käytetyille elektrodeille on esitetty liitteessä 2. Elektrodien pinta-ala laskettiin olettaen, että lanka on sylinterin muotoinen ja sen toinen pää on tasainen ja pyöreänmuotoinen. Näitä arvoja käytettiin kuvaajien virrantiheyksien laskemiseksi.

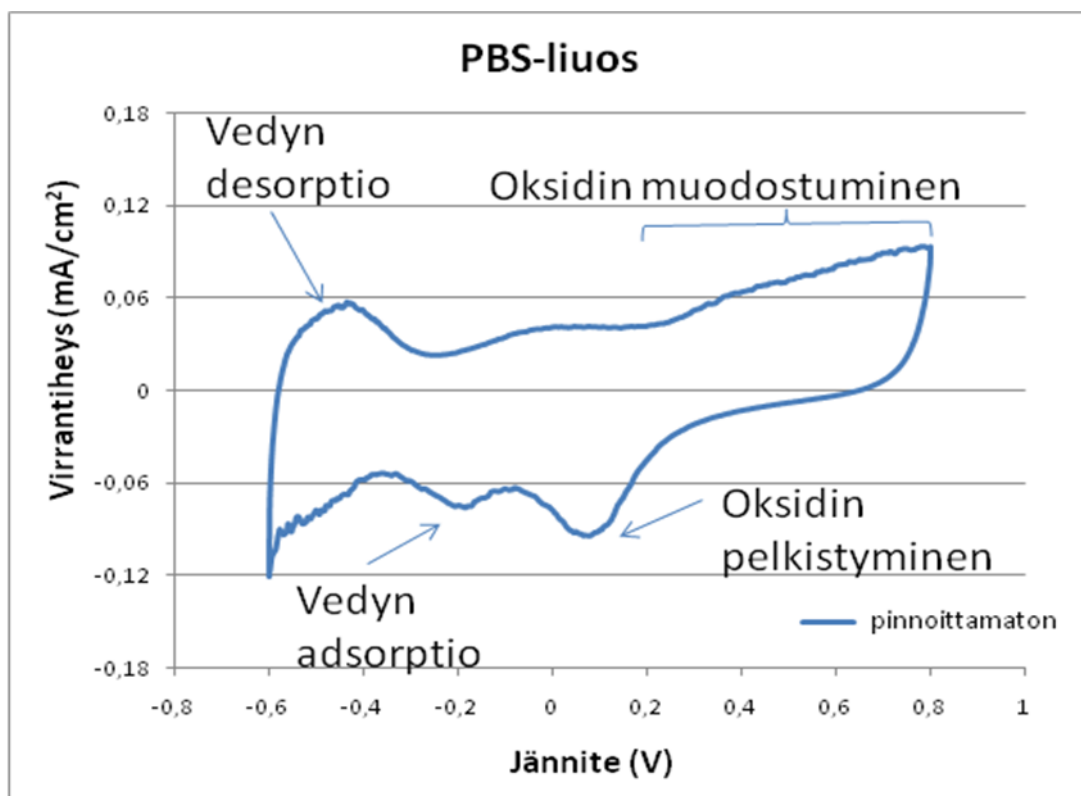
6.2 Mittaukset syklisellä voltammetrialla

Ensimmäisistä kokeista huomattiin, että vasteessa esiintyi epätasaisuutta kun elektrodit olivat keskellä kennoa vierekkäin. Tämä näkyy kuvasta 25, kun verrataan sinisen (keskellä kennoa vierekkäin) ja punaisen (kennon vastakkaisilla reunoilla) kuvaajan eroja. Vierekkäin olleiden elektrodien vaste on erityisesti 0,3 - 0,7 V alueella epätasaisempi kuin vastakkaisilla reunoilla olleiden elektrodien vaste vastaavassa kohdassa. Lisäksi elektrodien sijainti vierekkäin aiheutti paljon suuremman negatiivisen virrantiheyden heti mittauksen alussa. Tämän perusteella elektrodit sijoitettiin jatkossa kennon reunoille kauas toisistaan.

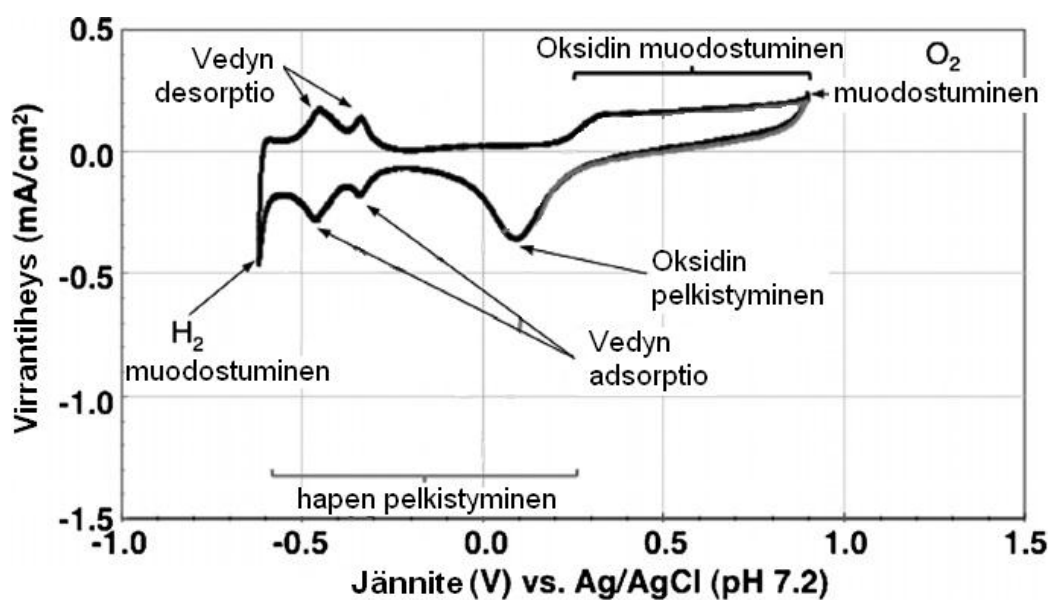


Kuva 25. Elektrodien sijainnista vierekkäin keskellä kennoa aiheutunut häiriöllinen vaste sinisellä, ja punaisella kennon reunoilla sijaitsevista elektrodeista saatu vaste.

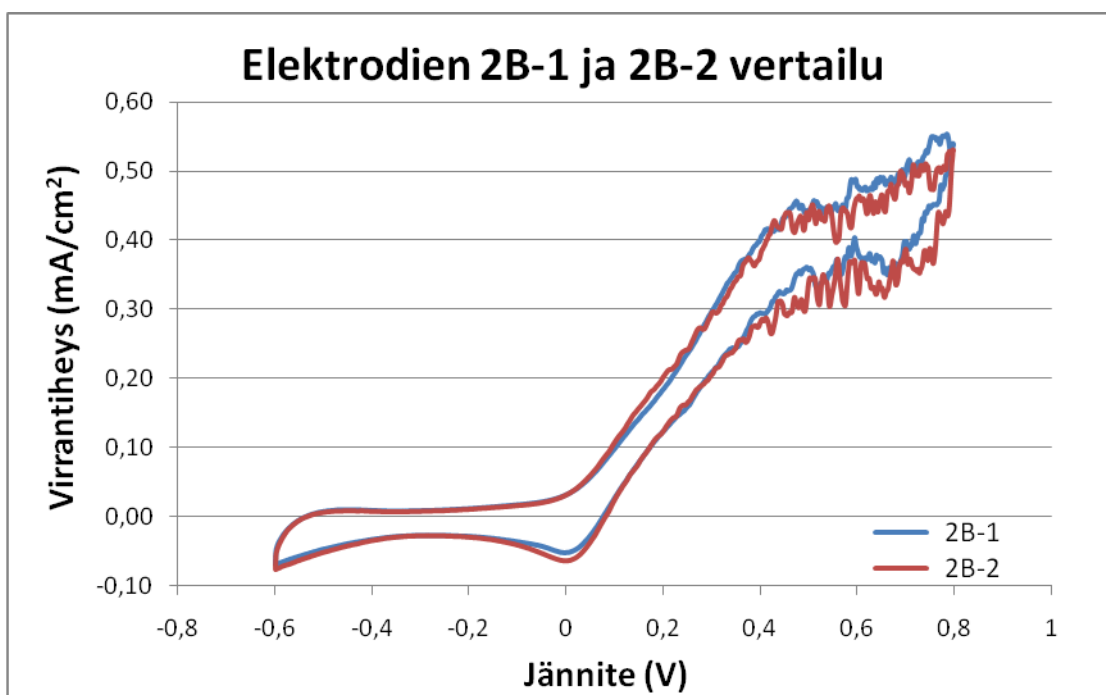
Ensimmäisen erän mittauksissa vastaelektrodi oli kooltaan yhtä pieni kuin työelektrodi. Kirjallisuudessa on esitetty, että vastaelektrodin tulee olla työelektrodia isompi pinta-alaltaan. Tällöin se ei hidasta mittausta rajoittamalla virrankulkua (Merrill et al. 2005). Suoritetut kokeet vahvistivat tämän, sillä vastaelektrodin ollessa työelektrodien kokoinen sen todettiin aiheuttavan hitautta mittaukseen. Toisen erän mittauksissa vastaelektrodi oli isompi kuin työelektrodit. Kuvassa 26 on esitetty pinnoittamattomalla elektrodilla saatu vaste PBS-liuoksesta, kun vastaelektrodi oli riittävän iso. Kuvasta nähdään, että isolla vastaelektrodilla saatiin vedyn desorptio, adsorptio ja oksidin muodostuminen ja pelkistyminen esiin ja samoihin jännitearvoihin kuin kuvassa 27. Samoin H₂ ja O₂ muodostuminen ovat havaittavissa samoissa jännitearvoissa näissä kahdessa kuvassa. Kuvat eroavat toisistaan käytetyllä pyyhkäisynopeudella.



Kuva 26. Pinnoittamattoman työelektroodin vaste PBS-liuoksessa.

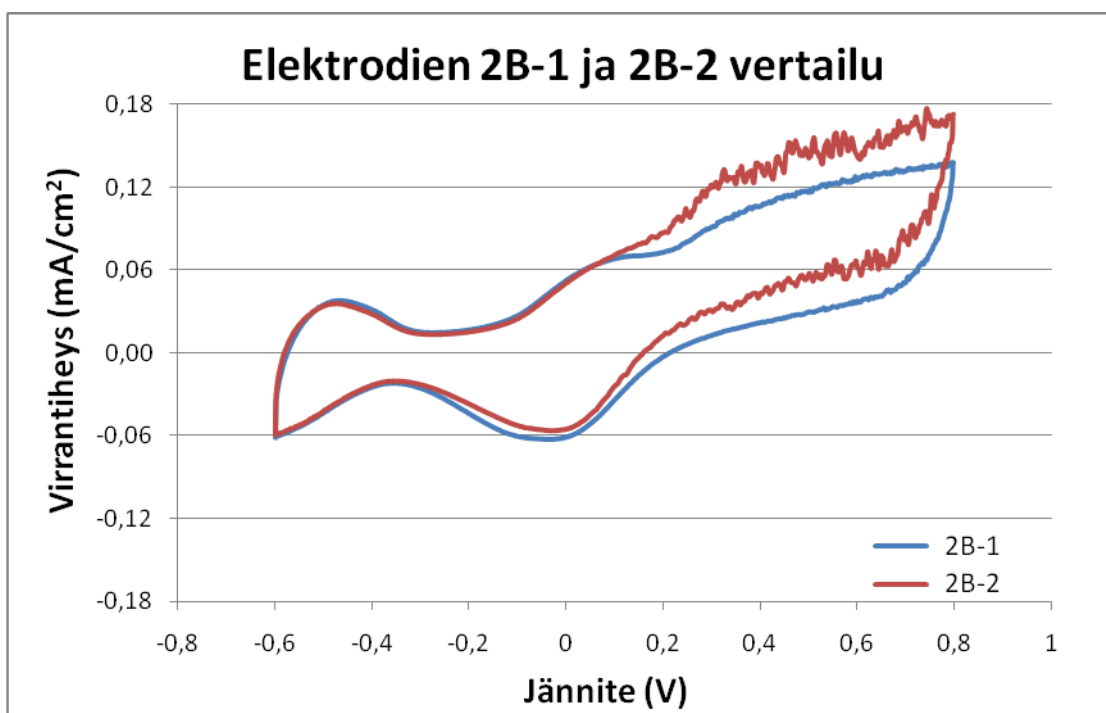


Kuva 27. Syklinen voltammogrammi platinalle PBS-liuoksessa (pH 7,2). Liuosta tyytetettiin ja mittaukset tehtiin -0,62 V - 0,90 V jännitevälillä pyyhkäisy nopeudella 100 mV/s. (muokattu lähteestä: Hudak et al. 2010)

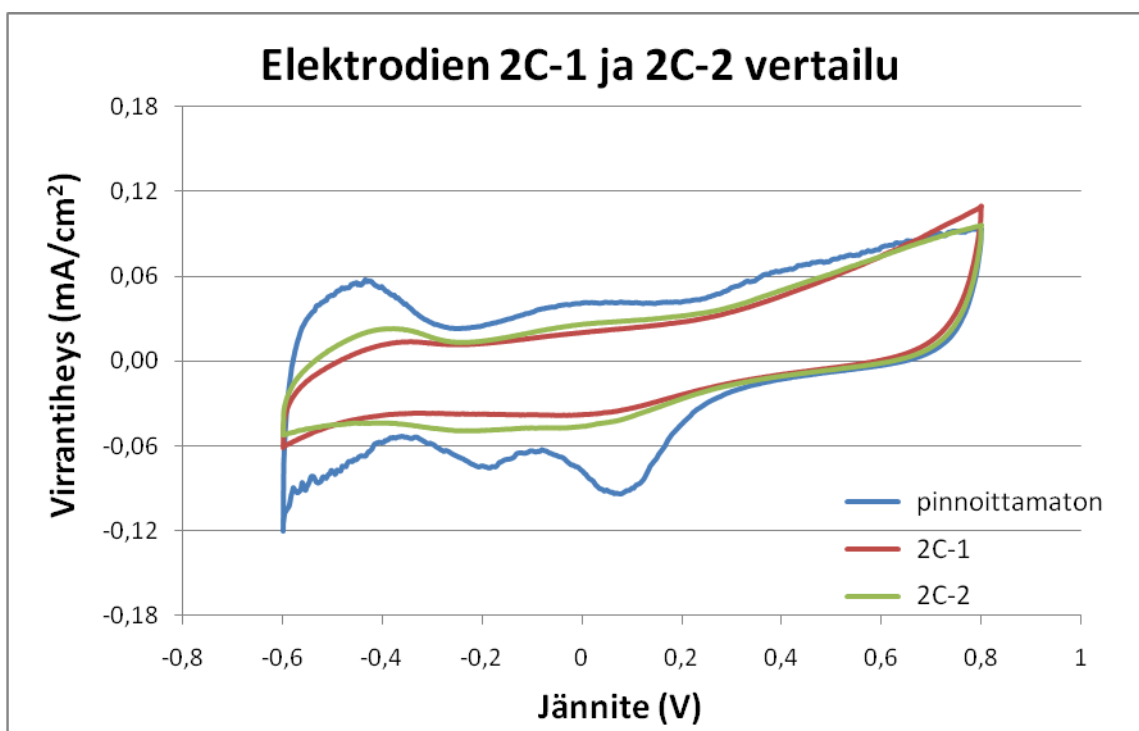


Kuva 28. 2B-1 ja 2B-2 -elektrodien vasteet PBS-liuoksessa, johon on lisätty 500 μ M dopamiinia.

Kuvasta 28 nähdään, että 2B-1 -elektrodi antaa hieman tasaisempia käyriä, kuin 2B-2. 2B-2 -elektrodin pinnalla oli ennen elektrodin käyttöä huomattu pieni pallomainen Nafion-kerrostuma, ja se todennäköisesti aiheutti epätasaisemman vasteen. 2B-1 vaikutti mittausten loppuun asti paremmin pinnoitetulta, sillä kuvasta 29 nähdään, että 2B-2:sen pinnoite on saattanut vaurioitua, sillä virrat nousivat korkeampiin arvoihin, kuin millään muulla elektrodilla askorbiinihappo-liuoksissa.

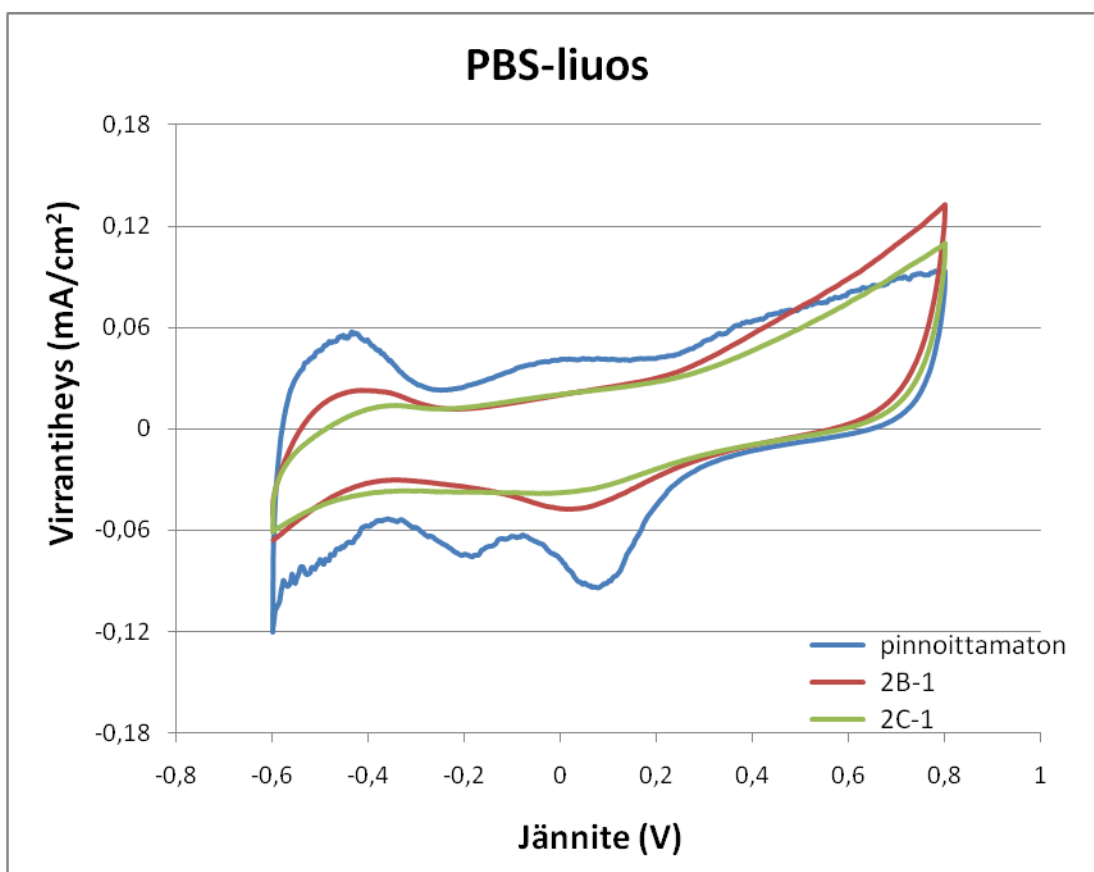


Kuva 29. 2B-1 ja 2B-2 -elektrodien vasteet PBS-liuoksessa, johon on lisätty 700 μ M askorbiinihappoa.



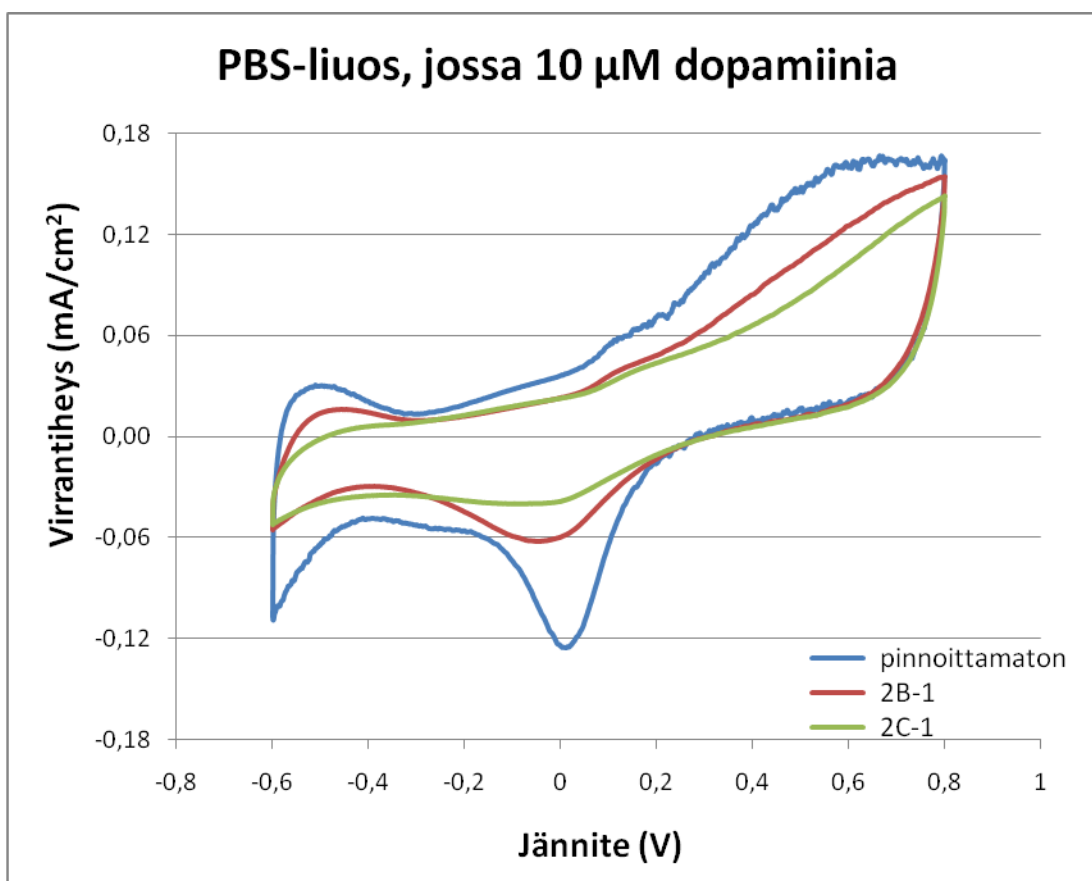
Kuva 30. Pinnoittamattoman, 2C-1 ja 2C-2 -elektrodien vasteet PBS-liuoksessa.

Kuvasta 30 nähdään, että 2C-1 -elektrodin pinnoite tasasi paremmin kuin 2C-2 pinnoittamattomalla elektrodilla nähtyjä piikkejä kohdissa -0,45 V, -0,18 ja 0,08. Sama voitiin havaita myös muiden mittausliuosten kuvien perusteella. Edellä esitettyjen kuvien 28 - 30 perusteella valittiin mittaustulosten vertailuelektrodeiksi 2B-1 ja 2C-1 -elektrodit. Niiden kuvaajia esitellään jatkossa verrattuna pinnoittamattomaan elektrodiiin.



Kuva 31. Elektrodien vasteet PBS-liuoksessa.

Kuvassa 31 on esitetty kolmen eri elektrodin vasteet PBS-liuoksessa. Sininen käyrä vastaa pinnoittamattomalla elektrodilla, punainen 2B-1:llä ja vihreä 2C-1:llä saatua vastetta. Kuvasta nähdään, että pinnoitekerrokset vaimentavat reaktioita elektrodilla, paitsi O₂:n muodostumista (kohdassa 0,8 V) ne lisäävät verrattuna pinnoittamattomaan elektrodiin. Lisäksi 2C-1 vaimentaa tehokkaammin kuin 2B-1 oksidin pelkistymistä (kohdassa 0,08 V), vedyn desorptiota (kohdassa -0,45 V) ja O₂:n muodostumista.

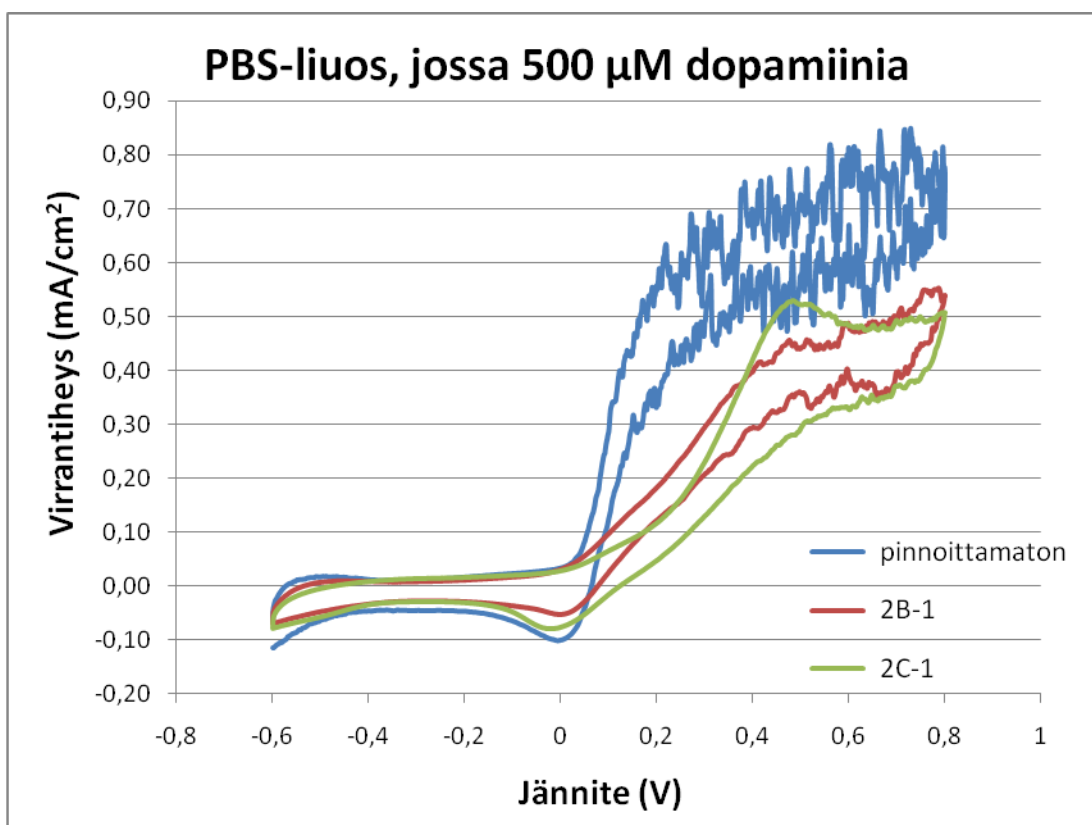


Kuva 32. Elektrodien vasteet PBS-liuoksessa, johon on lisätty 10 µM dopamiinia.

Kuvasta 32 nähdään elektrodien vasteiden erot, kun PBS-liuokseen lisättiin 10 µM dopamiinia. Dopamiinin huomataan alkavan vaikuttaa mittaukseen noin 0,05 V:n kohdalla, kun verrataan kuvaajia kuvaan 31. Tämä jännitteen arvo on huomattavasti matalampi kuin dopamiinin kirjallisuudessa arvioitu hapettumisjännite (0,20 V). Jälleen 2C-1 vaimentaa kuvaan 31 liittyen mainittuja reaktioita enemmän kuin 2B-1. Taulukossa 8 on verrattu PBS-liuoksen (kuva 31) ja PBS + 10µM DA -liuoksen (kuva 32) maksimivirrantiheyksiä. Taulukon arvoista nähdään, että dopamiinin vaikutuksesta maksimivirrantiheydet kasvoivat 16 % laimeammalla liuoksella ja 30 % vahvemmassa liuoksella pinnoitetuilla elektrodeilla. Pinnoittamattomalla elektrodilla vaste nousi kuitenkin 80 %. Dopamiinin lisäys liuokseen kasvatti siis saatua vastetta, eli elektrodit havaitsivat dopamiinin. Pinnoitettujen elektrodien virrantiheyden kasvu ei kuitenkaan ollut läheskään yhtä suurta kuin pinnoittamattomalla, joten pinnoitetut elektrodit eivät olleet kovinkaan herkkiä 10 µM dopamiinipitoisuudelle.

Taulukko 8. Maksimivirrantiheydet kolmelle eri elektrodille.

	Maksimivirrantiheydet (mA/cm ²)		Maksimivirrantiheyden muutos (%)
	PBS-liuos	PBS-liuos, jossa 10 µM dopamiinia	
2B-1	0,133	0,154	16
2C-1	0,110	0,143	30
pinnoittamaton	0,093	0,167	80



Kuva 33. Elektrodien vasteet PBS-liuoksessa, johon on lisätty 500 µM dopamiinia.

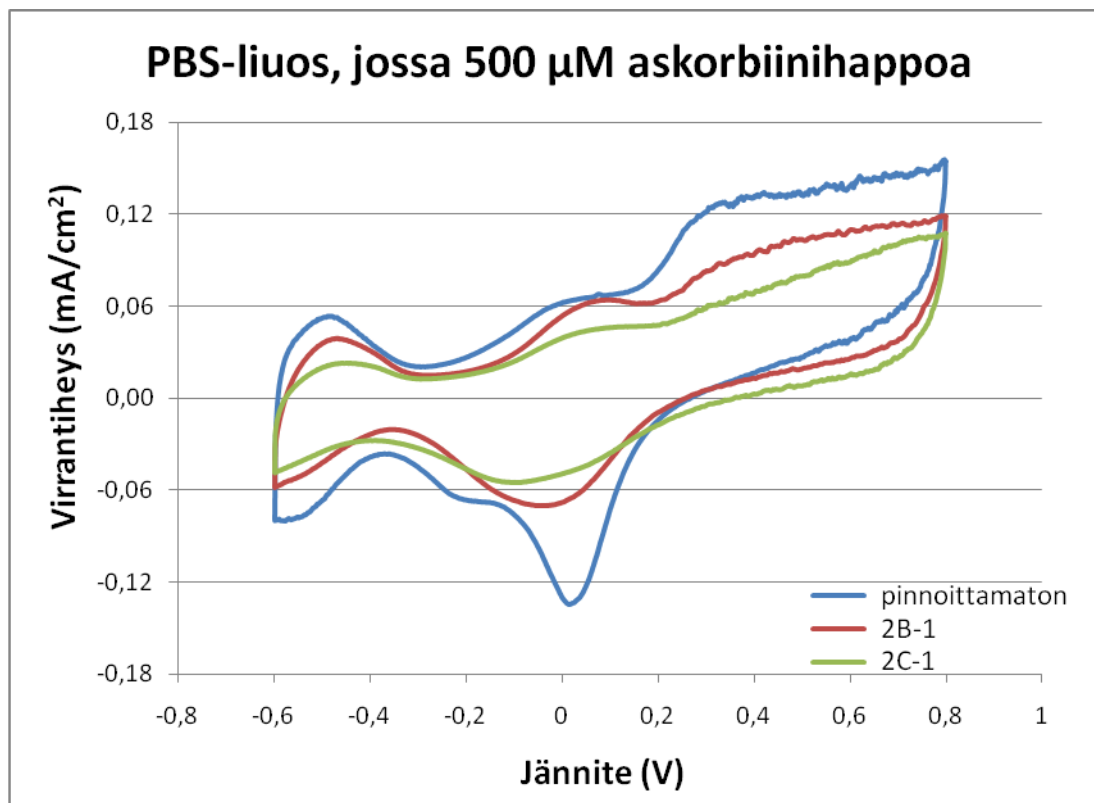
Kuvasta 33 nähdään kuinka 500 µM dopamiinin lisäys vaikutti eri elektrodien vasteeseen. Dopamiinin suuren pitoisuuden havainnoinnin elektrodeilla huomataan alkavan noin 0,01 V:n kohdalla, eli hieman aiemmin kuin pienemmän dopamiinikonsentraation havainnoinnin (0,05 V). Kuten 10 µM dopamiini -liuoksessa (kuva 32), tässäkin 2B-1 antaa suuremman vasteen dopamiinille kuin 2C-1. Taulukossa 9 on verrattu maksimivirrantiheyksiä PBS-liuoksessa (kuva 31) ja PBS + 500 µM dopamiinia -liuoksessa. Voidaan todeta, että dopamiinin lisäys kasvattaa enemmän 2C-1 -elektrodin vastetta kuin 2B-1:sen. Sama voitiin todeta 10 µM dopamiini -liuoksessakin. Vaikka siis 2C-1 virrantiheydet ovat arvoltaan pienempiä kuin 2B-1:llä, on maksimivirrantiheysien suhde PBS-liuoksesta saatuihin verrattuna suurempi. 2C-1 siis havaitsee enemmän dopamiinia ja rajaa paremmin pois epätoivottuja vasteita.

Vertaamalla kuvan 33 kuvaajia keskenään huomataan, että Nafion-kerrokset ovat selvästi tasanneet käyrien muotoja, eli estäneet vedyn desorptiota kohdassa -0,45 V, vedyn adsorptiota kohdassa -0,2 V ja oksidin pelkistymistä kohdassa 0,08 V. Kuitenkin laimealla liuoksella pinnoitettu elektrodi (2B-1) vähentää oksidin pelkistymistä enemmän, kuin vahvemmalli liuoksella pinnoitettu (2C-1).

Taulukko 9. Maksimivirrantiheydet kolmelle eri elektrodille.

	Maksimivirrantiheydet (mA/cm ²)		Maksimivirrantiheyden muutos (%)
	PBS-liuos	PBS-liuos, jossa 500 µM dopamiinia	
2B-1	0,133	0,554	317
2C-1	0,110	0,530	382
pinnoittamaton	0,093	0,849	813

Dopamiini-mittauksia keskenään vertaamalla voidaan todeta, että ainoa selkeä huippu dopamiinin hapettumiselle voidaan nähdä 500 μM pitoisuudella 2C-1 -elektrodilla (kuva 33). Siinä dopamiinille muodostuu selkeä erillinen huippu kohtaan 0,46 V.

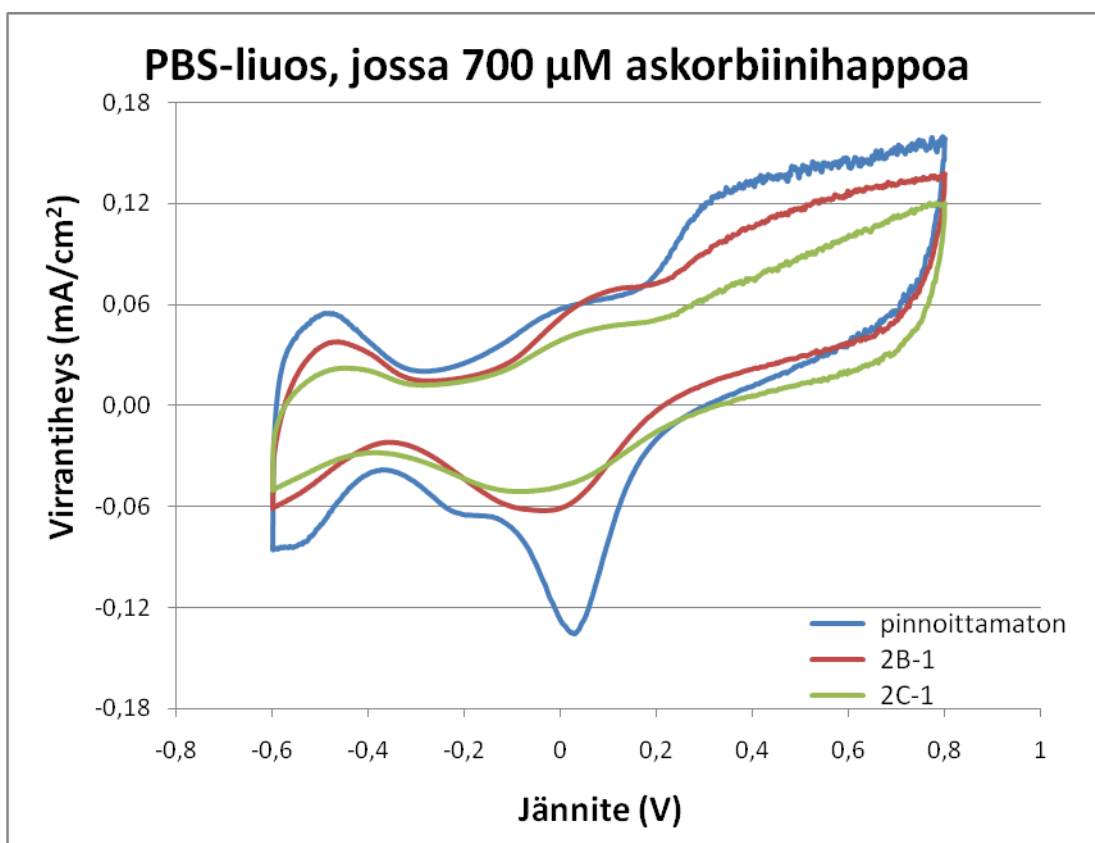


Kuva 34. Elektrodienvasteet PBS-liuoksessa, johon on lisätty 500 μM askorbiinihappoa.

Kuvasta 34 nähdään, kuinka 500 μM lisäys askorbiinihappoa vaikuttaa mittausvasteeseen. Askorbiinihappo alkaa vaikuttaa virrantiheyksiin jo -0,13 V:n jännitteessä, eli huomattavasti aiemmin kuin sen hapettumisjännitteessä (0,20 V). Se myös aiheuttaa 0,05 V jännitteessä pienen virrankasvun, joka voidaan havaita parhaiten 2B-1 vasteesta. Maksimivirrantiheyksien arvoista taulukossa 10 voidaan todeta, että 2C-1 vasteeseen askorbiinihapon lisäys ei juuri vaikuta, sillä sen vaste muuttuu vain 2 % pienemmäksi kuin pelkässä PBS-liuoksessa. Sen sijaan 2B-1 -elektrodilla askorbiinihapon lisäys nesteeseen pienentää vastetta 11 %. Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä askorbiinihapon lisäyksen jopa estävän O_2 :n muodostumista (kohdassa 0,8 V) ja vähintäänkin estävän tehokkaasti askorbiinihapon aiheuttamaa häiriötä.

Taulukko 10. Maksimivirrantiheydet kolmelle eri elektrodille.

	Maksimivirrantiheydet (mA/cm^2)		Maksimivirrantiheyden muutos (%)
	PBS-liuos	PBS-liuos, jossa 500 μM askorbaattia	
2B-1	0,133	0,119	-11
2C-1	0,110	0,108	-2
pinnoittamaton	0,093	0,156	68



Kuva 35. Elektrodien vasteet PBS-liuoksessa, johon on lisätty 700 μM askorbiinihappoa.

Kuvassa 35 nähdään 700 μM askorbiinihapon lisäyksen aiheuttama vaste eri elektrodeille. Askorbiinihapon voidaan huomata alkavan vaikuttaa mittaukseen samassa -0,13 V:n arvossa, kuin 500 μM askorbaattipitoisuudella. Samoin kuin kuvassa 34, tässäkin askorbaatti aiheuttaa 0,05 V jännitteessä pienen virrankasvun, joka voidaan havaita parhaiten 2B-1 vasteesta. Jälleen maksimivirrantiheydet kasvavat sitä mukaa mitä ohuempi kerros Nafionia on. Taulukossa 11 on esitetty elektrodien maksimivirrantiheydet suhteessa PBS-liuokseen. Vertaamalla arvoja taulukkoon 10 voidaan huomata, että askorbaatin havainnointi kasvaa elektrodilla, kun sen pitoisuus liuoksessa on suurempi.

Taulukko 11. Maksimivirrantiheydet kolmelle eri elektrodille.

	Maksimivirrantiheydet (mA/cm^2)		Maksimivirrantiheyden muutos (%)
	PBS-liuos	PBS-liuos, jossa 700 μM askorbaattia	
2B-1	0,133	0,138	4
2C-1	0,110	0,120	9
pinnoittamaton	0,093	0,159	71

Käytettyjä elektrodeja katsottiin silmämääräisesti mittausten lopuksi, eikä niissä ollut silmin huomattavia muutoksia. Nafion-kerrostumat PVC-muovin päällä olivat edelleen tallella. Tästä voidaan olettaa, että pinnoite ei kärsinyt mittauksista.

6.3 Tutkimustulosten tarkastelu

Pinnoitteiden paksuuden vaihtelu samalla tavalla valmistettujen elektrodien välillä oli hyvin suurta, ja pelkästään yhden saman elektrodin pinnoitepaksuus vaihteli useilla mikrometreillä. Vahvemmalla liuksella pinnoitettujen elektrodien pinnoitepaksuudet olivat 2,0 - 33,3 μm ja laimeammalla pinnoitettujen 0,6 - 4,3 μm . Pystysuoraan kuvatut pinnat saattavat olla kuvattuja juuri Nafion-kasaantumisen kohdalta, mikä selittää niiden pinnoitepaksuuden suuret vaihtelut. Vaakasuoraan kuvatuista elektrodeista kuitenkin nähtiin pinnoitetta isommalta alueelta, joten niistä arvioitujen mittojen tuloksia pidetään luotettavampina. Niiden laimeammalla liuksella pinnoitettujen paksuudet olivat 0,6 - 1,2 μm ja vahvemmalla 2,0 - 2,4 μm . Vahvemmalla liuksella pinnoitettujen paksuudet vastaavat hyvin kirjallisuudessa esitettyä (ks. kappale 4.2.2) 10 sekunnin upottamisella 5 % -liuokseen saatua 2 - 3 μm paksuista kerrosta (Chou et al. 2009).

Lopulta kahdella eri tavalla pinnoitettujen elektrodien pinnoitteiden paksuudella ei ollut suurta eroa, vaikka useampaan kertaan kastamisella oletettiin saavan paksumpia kerroksia. Ongelma saattaa kuitenkin johtua kastamisajasta, sillä alkoholi-liuosten tiedetään liuottavan Nafionia pois elektrodin pinnalta (Chou et al. 2005). Voi siis olla, että useammasta kastamisesta ei ole hyötyä, sillä edellistä kerrosta liukenee aina vähän pois. Nafionin liukenemiseen saattaa vaikuttaa kastamisaika, joten jos elektrodit kastettaisiin liuokseen vain alle sekunniksi, ehkä liukenemista ei tapahtuisi.

Kuvassa 22 näkyvän lohkeaman syntyperä jäi epäselväksi. Pinnoitteen epätasaisuudesta johtuen se saattaa myös lohjeta helpommin. Muissa näytteissä ei kuitenkaan vastaavanlaista halkeamaa ollut. Samalla tavoin pinnoitetut elektrodit toimivat pitkään lähes samalla tavalla, joten saattaa olla, että pienet vaihtelut elektrodin pinnoitteessa eivät vaikuta mittauksiin merkittävästi. Jotta pinnoitteiden paksuutta voitaisiin kontrolloida paremmin, tulisi selvittää useammalla näytteellä pinnoitteiden vaihteluita, sekä näytteenpidikkeen ja hionnan aiheuttamaa vauriota Nafion-pinnoitteelle. Pinnoitusmenetelmistä olisi tehtävä kokonaisvaltainen tutkimus, jotta paras tapa ja paras liuoksen vahvuus saataisiin määriteltyä.

Mittauksista syklisellä voltammetrialla voidaan todeta, että dopamiinimitauksissa 2C-1 -elektrodin virrantiheydet kasvoivat prosentuaalisesti enemmän kuin 2B-1 -elektrodin. Tämä viittaa 2C-1:sen parempaan kykyyn havaita dopamiinia. Kirjallisuudessa on esitetty (Chou et al. 2009), että Nafion-pinnoitteen ansiosta dopamiinin aiheuttamat virrat ovat paljon suurempia kuin paljaalla elektrodilla mitatut virrat. Tämän työn kokeissa virrantiheydet eivät kuitenkaan olleet suurempia pinnoitetuilla elektrodeilla dopamiinia mitatessa. Askorbiinihapon vaikutusta mittaukseen puolestaan esti paremmin 2B-1- elektrodi. Erikoista on, että vahvemmalla liuksella pinnoitettu elektrodi havaitsi dopamiinia paremmin. Laimeammalla liuksella pinnoitettu puolestaan poisti paremmin häiriöaineen vaikutuksia. Tästä päätellen voidaan olettaa, että laimeammalla liuksella pinnoitetun elektrodin pinnoite on paksumpi. Samalla kuitenkin sen herkkyys kärsii, sillä paksumpi kerros Nafionia on liian paksu dopamiinin tarkkaan mittaamiseen. Virhettä näihin mittaustuloksiin saattaa aiheuttaa kuitenkin myös elektrodien pinta-alojen arvioiminen virrantiheys-kuvaajia varten, sillä muutamien mikrometrien vaihtelu pinnoitepaksuudessa vaikuttaa jo paljon todelliseen pinta-alaan.

Kirjallisuudessa esitettyjen syklisen voltammogrammien muodot eivät aivan vastaa työssä saatuja kuvaajia, mutta syklisen voltammogrammin muodon tiedetään riippuvan epätasaisesta pinnoitteesta, elektrodin pinta-alasta, valitusta jännitevälistä ja pyyhkäisy nopeudesta (ks. kappale 3.1.4). Muissa tutkimuksissa PBS-liuoksen aiheuttamat vasteet ovat rajautuneet paremmin pois ja dopamiinin mittausta on näkynyt selkeänä huippuna kuvaajassa. Kuitenkin niin dopamiinin kuin askorbaatin mittauksissa jännitteet, joissa niiden huomattiin alkavan vaikuttaa mittaukseen, ovat huomattavasti alempia kuin niiden kirjallisuudessa esitetyt hapettumisjännitteet. Toisaalta tämän työn kuvaajissa nähtävät dopamiinista johtuvat huiput eivät ole lähellä 0,2 V, eli dopamiinin hapettumisjännitettä, vaan ne ovat mittauksen korkeimman käytetyn jännitteen kohdalla 0,8 V:ssa. Tämän uskotaan johtuvan vasteen hitaudesta, ja siis pinnoitteen liian suuresta paksuudesta, sillä Nafionin tiedetään kasvattavan elektrodin vasteaika (ks. kappale 4.2.2). Kirjallisuudessa on esitetty 6,7 μm paksuuden riittävän askorbaatin vasteen poistamiseksi (Pan & Arnold 1996), mutta mittauksen vasteaikaan ei otettu kantaa (ks. kappale 4.2.2). Tämän työn mittausten perusteella pinnoite ei kuitenkaan saisi olla ainakaan paksumpi kuin 1 μm dopamiinin mittaamiseksi. Tämä paksuus vaikutti myös riittävän tämän työn kokeissa askorbaatin aiheuttaman vasteen poissulkemiseen.

Työn tavoitteena oli tutkia Nafion-pinnoitteen vaikutusta dopamiinin ja askorbaatin mittaamiseen. Tulosten perusteella voidaan todeta, että Nafion-pinnoite poisti negatiivisesti varautuneen askorbiinihapon vaikutusta mittaukseen. Dopamiinin mittaukseen puolestaan 1 ja 2 μm Nafion-kerrokset olivat liian paksuja.

7 Yhteenveto

Tämän työn kirjallisessa osiossa esiteltiin erilaisia elektrodiratkaisuja keskushermoston välittäjäaineiden pitoisuuden mittaamiseen sähkökemiallisin menetelmin. Esitettyjen ratkaisuiden perusteella työssä valittiin tutkimuskohteeksi Nafion-polymeerillä pinnoitettujen elektrodien toiminnan tutkiminen syklisellä voltammetrialla. Mitattaviksi aineiksi valittiin dopamiini ja sen mittaukseen vaikuttava häiriöaine askorbaatti. Useissa tutkimuksissa on Nafion-pinnoitteella saatu hyviä tuloksia häiriöaineiden mittaussvasteiden poissulkemiseksi.

Työssä valmistettiin platina-iridiumlangasta elektrodeja, joista osa pinnoitettiin Nafionilla. Pinnoittamisessa kokeiltiin kahta erilaista tapaa. Pinnat olivat useimmissa näytteissä epätasaisia ja niiden paksuus vaihteli paljon samassa näytteessä. Näiden erojen arveltiin johtuvan pinnoittamisessa käytetystä kastamisajasta liuoksessa, elektrodin jatkokäsittelystä pinnoituksen jälkeen ja Nafionin pehmeystestä. Vaurioita saattoivat aiheuttaa SEM-kuvaamista varten tehdyt toimenpiteet: elektrodin kiinnittäminen näytteenpidikkeellä epoksiin upottamista varten tai hionta ja kiillotus. Vaurioiden uskottiin johtuvan enimmäkseen näytteenpidikkeestä sekä kastamisajoista.

Elektrodipinnoitteiden epätasaisuudesta huolimatta saatiin syklisellä voltammetrialla mitattua odotetunlaisia kuvaajia. Pinnoittamattomien ja pinnoitettujen elektrodien toimintaa verrattiin viidessä eri liuoksessa, joista kahteen oli lisätty dopamiinia ja kahteen askorbaattia eri voimakkuuksina. Tehtyjen mittausten perusteella voidaan todeta, että Nafion toimii hyvänä häiriönpoistajana. Odotetusti Nafion-pinnoitetut elektrodit vaimensivat pinnoittamattomalla elektrodilla nähtyjä piikkejä, jotka muodostuvat vedyn adsorptiosta, vedyn desorptiosta ja oksidin pelkistymisestä. Tämän lisäksi voitiin todeta, että pinnoitteet paransivat vähän dopamiinin mittausta vaimentamalla muita mittaussvasteita. Askorbaatin aiheuttamien vasteiden todettiin pienenevän sitä mukaa mitä vahvemalla liuoksella elektrodi oli pinnoitettu.

Dopamiinin pienempi konsentraatio (10 μM) havaittiin elektrodilla, mutta pinnoite myös esti dopamiinia pääsemästä elektrodille nopeasti. Moninkertaisesti pienempien todellisten dopamiinikonsentraatioiden mittaamiseksi tarvitaan kuitenkin matalamman havaitsemisrajan ja nopeamman vasteajan elektrodi. Nafion-pinnoitteen paksuudelle täytyisi löytyä optimaalinen paksuus, joka ei ole liian paksu pienien konsentraatioiden mittaamiseksi, mutta on tarpeeksi paksu häiriöaineiden poissulkemiseksi. Suurin ongelma Nafion-pinnoitetuissa elektrodeissa vaikutti olevan kuitenkin niiden toistettavuus. Tässä työssä kokeillut kaksi pinnoitusmenetelmää eivät tuottaneet tasalaatuisia elektrodeja. Jotta saadaan selville parhain tapa valmistaa ohut, kestävä ja tasainen pinta, on tehtävä järjestelmällinen tutkimus eri pinnoitusmenetelmistä. Nafionia tutkitaan jatkuvasti välittäjäaineiden mittaamiseen käytettävien elektrodien pinnoitteena, joten ainakaan vielä sille ei ole löydetty parempaa korvaajaa.

8 Lähteet

Alwarappan, Subbiah & Erdem, Arzum & Liu, Chang & Li, Chen-Zhong. 2009. *Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications*. J. Phys. Chem. C. Vol. 113. S. 8853–8857.

A4M. 2005. *GABA* [verkkodokumentti] The American Academy of Anti-Aging Medicine. [viitattu 20.5.2011] Saatavilla: http://www.worldhealth.net/news/gamma_aminobutyric_acid_gaba/.

Banks, Craig E. & Compton, Richard G. 2005. *Exploring the electrocatalytic sites of carbon nanotubes for NADH detection: an edge plane pyrolytic graphite electrode study*. Analyst. Vol. 130. S. 1232–1239. DOI: 10.1039/b508702c.

Baur, John E. & Kristensen, Eric W. & May, Leslie J. & Wiedemann, Donna J. & Wightman, R. Mark. 1988. *Fast-Scan Voltammetry of Biogenic Amines*. Anal. Chem. Vol. 60. S. 1268-1272.

Becker, Bernhard F. 1993. *Towards the physiological function of uric acid*. Free Radical Biology and Medicine. Vol. 14:6. S. 615-631. DOI: 10.1016/0891-5849(93)90143-I.

Bolton, E & Wang, Y & Thiessen, P. A. & Bryant, S. H. 2008. *PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities*. Annual Reports in Computational Chemistry. Vol. 4. Chapter 12. S. 217-241. DOI: 10.1016/S1574-1400(08)00012-1 [viitattu 28.4.2011] Verkkotietokanta saatavilla: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Boxall, Naomi & Tweedie, John. 2011. *Amino Acids* [verkkodokumentti]. New Zealand Massey University, Institute of Molecular BioSciences. (Viitattu 27.4.2011) Saatavilla: <http://www.massey.ac.nz/~wwbioch/Prot/amino/frameset.htm>.

Bradford, H. F. 1995. *Glutamate, GABA and Epilepsy*. Progress in Neurobiology. Vol. 47. S. 477 - 511.

Breier, A & Su, T.-P. & Saunders, R. & Carson, R. E. & Kolachana B. S. & de Bartolomeis, A. & Weinberger, D. R. & Weisenfeld, N. & Malhotra, A. K. & Eckelman, W. C. & Pickar, D. 1997. *Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: Evidence from a novel positron emission tomography method*. PNAS. Vol. 94:6. S. 2569-2574.

Brookmeyer, R & Johnson, E & Ziegler-Graham, K & Arrighi, HM. 2007. *Forecasting the global burden of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement. Vol. 3:3. S. 186-91.

Burmeister, Jason J. & Moxon, K. & Gerhardt, G. A. 2000. *Ceramic-based multisite microelectrodes for electrochemical recordings*. Anal Chem. Vol. 72:1. S. 187-92.

- Burmeister, Jason J. & Gerhardt, Greg A. 2001. *Self-Referencing Ceramic-Based Multisite Microelectrodes for the Detection and Elimination of Interferences from the Measurement of l-Glutamate and Other Analytes*. Anal. Chem. Vol. 73:5. S. 1037–1042. DOI: 10.1021/ac0010429.
- Burmeister, Jason J. & Pomerlau, Francois & Palmer, Michael & Day, Brian K. & Huettl, Peter & Gerhardt, Greg A. 2002. *Improved ceramic-based multisite microelectrode for rapid measurements of l -glutamate in the CNS*. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 119:2. S. 163-171. DOI: 10.1016/S0165-0270(02)00172-3.
- Burmeister, Jason J. & Gerhardt, Greg A. 2003a. *Ceramic-based multisite microelectrode arrays for in vivo electrochemical recordings of glutamate and other neurochemicals*. Trends in Analytical Chemistry. Vol. 22:8. S. 498-502. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00904-X.
- Burmeister, Jason J. & Palmer, Michael & Gerhardt, Greg A. 2003b. *Ceramic-based multisite microelectrode array for rapid choline measures in brain tissue*. Analytica Chimica Acta. Vol. 481:1. S. 65-74. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00067-9.
- Castellanos, M. & Sobrino, T. & Pedraza, S. & Moldes, O. & Pumar, J. M. & Silva, Y. & Serena, J. & García-Gil, M. & Castillo, J. & Dávalos, A. 2008. *High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke*. Neurology. Vol. 71: 23. S. 1862-1868. DOI: 10.1212/01.wnl.0000326064.42186.7e.
- Chakraborty, Sudip & Raj, C. Retna. 2007. *Amperometric biosensing of glutamate using carbon nanotube based electrode*. Electrochemistry Communications. Vol. 9. S. 1323-1330. DOI: 10.1016/j.elecom.2007.01.039.
- Chang, K. S. & Chang, C. K. & Chou, S. F. & Chen, C. Y. 2007. *Sequential measurement of aminotransferase activities by amperometric biosensors*. Biosens Bioelectron. Vol. 22:12. S. 2914-20.
- Chauhan, Dheeraj S. & Pandey, Prem C. 2009. *Application of tris(2-2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Nafion-ormosil-modified electrode in selective sensing of dopamine*. Sensors. S. 1135-1139. ISSN: 1930-0395. ISBN: 978-1-4244-4548-6. DOI: 10.1109/ICSENS.2009.5398577.
- Chen, Po-Yen & Vittal, R. & Nien, Po-Chin & Ho, Kuo-Chuan. 2009. *Enhancing dopamine detection using a glassy carbon electrode modified with MWCNTs, quercetin, and Nafion®*. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 24:12. S. 3504-3509. DOI: 10.1016/j.bios.2009.05.003.
- Chen, Siming & Yang, Wensheng & Chen, Xu. 2010. *Highly Sensitive and Selective Determination of Dopamine Based on Graphite Nanosheet-Nafion Composite Film Modified Electrode*. Electroanalysis. Vol. 22:9. S. 908-911. DOI: 10.1002/elan.200900511.

Chou, Ju & McFarland, Eric W. & Metiu, Horia. 2005. *Electrolithographic Investigations of the Hydrophilic Channels in Nafion Membranes*. J. Phys. Chem. B. Vol. 109. S. 3252-3256. DOI: 10.1021/jp0457848.

Chou, Ju & Ilgen, Terri J. & Gordon, Scott & Ranasinghe, Asanga D. & McFarland, Eric W. & Metiu, Horia & Buratto, Steven K. 2009. *Investigation of the enhanced signals from cations and dopamine in electrochemical sensors coated with Nafion*. Journal of Electroanalytical Chemistry. Vol. 632:1-2. S. 97-101. DOI: 10.1016/j.jelechem.2009.04.002.

Church, William H. & Justice, Joseph B. Jr. 1987. *Rapid Sampling and Determination of Extracellular Dopamine in Vivo*. Anal. Chem. Vol. 59:5. S. 712-716. DOI: 10.1021/ac00132a007.

Cogan, S. F. & Plante, T. D. & Ehrlich, J. 2004. *Sputtered iridium oxide films (SIROFs) for low-impedance neural stimulation and recording electrodes*. Engineering in Medicine and Biology Society, 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS. S. 4153 – 4156. ISBN: 0-7803-8439-3. DOI: 10.1109/IEMBS.2004.1404158.

Cogan, S. F. 2008. *Neural stimulation and recording electrodes*. Annual Review of Biomedical Engineering. Vol. 10. S. 275-309. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518.

Covey, D. P. & Garriss, P. A. 2009. *Using fast-scan cyclic voltammetry to evaluate striatal dopamine release elicited by subthalamic nucleus stimulation*. Engineering in Medicine and Biology Society. EMBC. Annual International Conference of the IEEE. S. 3306 – 3309. DOI: 10.1109/IEMBS.2009.5333768.

Coyle, J. T. & Price, D. L. & DeLong, M. R. 1983. *Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervations*. Science. Vol. 219:4589. S. 1184-1190. DOI: 10.1126/science.6338589.

Cui, Xinyan & Lee, Valerie A. & Raphael, Yehoash & Wiler, James A. & Hetke, Jammie F. & Anderson, David J. & Martin, David C. 2001. *Surface modification of neural recording electrodes with conducting polymer/biomolecule blends*. Journal of Biomedical Materials Research. Vol. 56:2. S. 261-272. DOI: 10.1002/1097-4636(200108)56:2<261::AID-JBM1094>3.0.CO;2-I.

Cui, Xinyan & Martin, David C. 2003. *Electrochemical deposition and characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on neural microelectrode arrays*. Sensors and Actuators B: Chemical. Vol. 89:1-2. S. 92-102. DOI: 10.1016/S0925-4005(02)00448-3.

Dailly, Eric & Chenu, Franck & Renard, Caroline E. & Bourin, Michel. 2004. *Dopamine, depression and antidepressants*. Review. Fundamental & Clinical Pharmacology. Vol. 18. S. 601–607. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2004.00287.x.

Davis, James & Huw Vaughan, D. & Cardosi, Marco F. 1995. *Review: Elements of biosensor construction*. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 17:12. S. 1030-1035. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00013-5.

Deng, Chunyan & Chen, Jinhua & Wang, Mengdong & Xiao, Chunhui & Nie, Zhou & Yao, Shouzhao. 2009. *A novel and simple strategy for selective and sensitive determination of dopamine based on the boron-doped carbon nanotubes modified electrode*. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 24. S. 2091–2094. DOI: 10.1016/j.bios.2008.10.022.

Duckworth, Paul. 1999. *EChem User's Guide & using Chart & Scope software for Electrochemistry*. Version 1.5. ADInstruments Pty Ltd. Document Number: U-MS600-UG-03A.

Duodecim. 2010. *Terveyskirjasto* [verkkotietokanta] Duodecim. [viitattu 22.6.2011]. Saatavilla: <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti>.

Edell, D.J. & Toi, V.V. & McNeil, V.M. & Clark, L.D. 1992. *Factors influencing the biocompatibility of insertable silicon microshafts in cerebral cortex*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering. Vol. 39:6. S. 635-643. DOI: 10.1109/10.141202.

Encyclopædia Britannica. 2011. *Acetylcholine*. [verkkodokumentti] Encyclopædia Britannica Online. [viitattu 20.5.2011] Saatavilla: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/3318/acetylcholine>.

EPDA. 2011. *Prevalence of Parkinson's disease*. [verkkodokumentti] European Parkinson's disease association. [viitattu 20.7.2011] Saatavilla: <http://www.parkinsonsawareness.eu.com/campaign-literature/prevalence-of-parkinsons-disease/>.

Farlex. 2011. *The free dictionary*. [verkkotietokanta] Farlex, Inc. [viitattu 16.3.2011] Saatavilla: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/cation-exchange+resin>.

Gaspary, Heidi L. & Wang, Wengang & Richerson, George B. 1998. *Carrier-Mediated GABA Release Activates GABA Receptors on Hippocampal Neurons*. AJP - JN Physiol. Vol. 80:1. S. 270-281.

Gerhardt, G. A. & Hoffman, A. F. 2001. *Effects of recording media composition on the responses of Nafion-coated carbon fiber microelectrodes measured using high-speed chronoamperometry*. J Neurosci Methods. Vol. 109:1. S. 13-21.

Goff, Donald C. & Coyle, Joseph T. 2001. *The Emerging Role of Glutamate in the Pathophysiology and Treatment of Schizophrenia*. Am J Psychiatry. Vol. 158. S. 1367–1377.

Guyton, Arthur C. & Hall, John E. 1996. *Textbook of medical physiology*, 9th edition. USA: W.B. Saunders Company. ISBN: 0-7216-5944-6.

Harrison, D. Jed & Turner, Robin F. B. & Baltes, H. P. 1988. *Characterization of perfluorosulfonic acid polymer coated enzyme electrodes and a miniaturized integrated potentiostat for glucose analysis in whole blood*. Anal. Chem. Vol. 60:19. S. 2002–2007. DOI: 10.1021/ac00170a003.

Hart, Harold & Craine, Leslie E. & Hart, David J. 2003. *Organic Chemistry – a short course, 11th edition*. USA: Houghton Mifflin Company. ISBN: 0-618-215360.

Hibbert, D. Brynn & Weitzner, Karyn & Tabor, Bruce & Carter, Paul. 2000. *Mass changes and dissolution of platinum during electrical stimulation in artificial perilymph solution*. Biomaterials. Vol. 21:21. S. 2177-2182. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00146-0.

Huang, Jianshe & Liu, Yang & You, Tianyan. 2010. *Carbon nanofiber based electrochemical biosensors: A review*. Anal. Methods. Vol. 2. S. 202–211. DOI: 10.1039/b9ay00312f.

Huber, M. & Heiduschka, P. & Kienle, S. & Pavlidis, C. & Mack, J. & Walk, T. & Jung, G. & Thanos S. 1998. *Modification of glassy carbon surfaces with synthetic laminin-derived peptides for nerve cell attachment and neurite growth*. Journal of Biomedical Materials Research. Vol. 41:2. S. 278–288. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199808)41:2<278::AID-JBM13>3.0.CO;2-H.

Hudak, E. M. & Mortimer, J. T. & Martin, H. B. 2010. *Platinum for neural stimulation: voltammetry considerations*. Journal of Neural Engineering. Vol. 7. DOI: 10.1088/1741-2560/7/2/026005.

Hulthe, Peter & Hulthe, Barbro & Johannessen, Kenn & Engel, Jörgen. 1987. *Decreased ascorbate sensitivity with nafion-coated carbon fibre electrodes in combination with copper(II) ions for the electrochemical determination of electroactive substances in vivo*. Analytica Chimica Acta. Vol. 198. S. 197-206. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)85020-5

Huong, Vu Thi & Shimanouchi, Toshinori & Quan, Do Phuc & Umakoshi, Hiroshi & Viet, Pham Hung & Kuboi, Ryoichi. 2009. *Polymethylthiophene/Nafion-modified glassy carbon electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid*. Journal of Applied Electrochemistry. Vol. 39:10. S. 2035-2042. DOI: 10.1007/s10800-009-9860-z.

Iijima, Sumio. 1991. *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature. Vol. 354. S. 56-58. DOI: 10.1038/354056a0.

Inokuchi, Hiroaki & Kato, Dai & Ueda, Akio & Niwa, Osamu. 2011. *Development of a Sputtered Nanocarbon Film Based Microdisk Array Electrode for the Highly Stable Detection of Serotonin*. Electroanalysis. Vol. 23:4. S. 827-831. DOI: 10.1002/elan.201000636.

Jacobson, Kenneth A. & Marshall, Thomas & Mine, Kazanori & Kirk, Kenneth L. & Linnoila, Markku. 1985. *Electrochemical detection of biogenic amines following acylation by N-hydroxysuccinimide esters*. FEBS Letters. Vol. 188:2. S. 307-311. DOI: 10.1016/0014-5793(85)80392-6.

Jia, JP & Jia, JM & Zhou, WD & Xu, M & Chu, CB & Yan, X & Sun, YX. 2004. *Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of*

patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. Chin Med J (Engl). Vol. 117:8. S. 1161-4.

Johnson, George. 2008. *Backgrounders: The Synapse and Drug Addiction*. [verkkodokumentti] [viitattu 27.4.2011] Saatavilla: <http://www.txtwriter.com/backgrounders/Drugaddiction/drugs1.html>.

Johnson, Matthew D. & Otto, Kevin J. & Kipke, Daryl R. 2005. *Repeated Voltage Biasing Improves Unit Recordings by Reducing Resistive Tissue Impedances*. IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering. Vol. 13:2. DOI: 10.1109/TNSRE.2005.847373.

Karyakin, A. A. & Karyakina, E. E. & Gorton, L. 2000. *Amperometric biosensor for glutamate using prussian blue-based "artificial peroxidase" as a transducer for hydrogen peroxide*. Anal Chem. Vol. 72:7. S. 1720-3.

Keefer, Edward W. & Botterman, Barry R. & Romero, Mario I. & Rossi, Andrew F. & Gross, Guenter W. 2008. *Carbon nanotube coating improves neuronal recordings*. Nature Nanotechnology. Vol. 3. S. 434-439. DOI: 10.1038/nnano.2008.174.

Kim, Young-Tae & Hitchcock, Robert W. & Bridge, Michael J. & Tresco, Patrick A. 2004a. *Chronic response of adult rat brain tissue to implants anchored to the skull*. Biomaterials. Vol. 25:12. S. 2229-2237. DOI:10.1016/j.biomaterials.2003.09.010.

Kim, D. H & Abidian, M & Martin, D. C. 2004b. *Conducting polymers grown in hydrogel scaffolds coated on neural prosthetic devices*. J Biomed Mater Res A. Vol. 71:4. S. 577-85.

Kim, Sang-Uck & Lee, Kun-Hong. 2004c. *Carbon nanofiber composites for the electrodes of electrochemical capacitors*. Chemical Physics Letters. Vol. 400. S. 253–257. DOI: 10.1016/j.cplett.2004.10.124.

Kincses, Zsigmond Tamas & Vecsei, Laszlo. 2010. *Review: Pharmacological Therapy in Parkinson's Disease: Focus on Neuroprotection*. CNS Neuroscience & Therapeutics. Vol. 00. S. 1–23. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00150.x.

Knox, C & Law, V & Jewison, T & Liu, P & Ly, S & Frolkis, A & Pon, A & Banco, K & Mak, C & Neveu, V & Djoumbou, Y & Eisner, R & Guo, A. C. & Wishart, D. S. 2011. *DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs*. Nucleic Acids Res. [verkkotietokanta] Vol. 39. Database issue: D1035-41. [viitattu 15.4.2011] Saatavilla: www.drugbank.ca.

Krishnan, Vaishnav & Nestler, Eric J. 2008. *The molecular neurobiology of depression*. Nature. Vol. 455. DOI: 10.1038/nature07455.

Kulagina, Nadezhda V. & Shankar, Latha & Michael, Adrian C. 1999. *Monitoring Glutamate and Ascorbate in the Extracellular Space of Brain Tissue with Electrochemical Microsensors*. Anal. Chem. Vol. 71:22. S. 5093–5100. DOI: 10.1021/ac990636c.

- Kumar, Annamalai Senthil & Swetha, Puchakayala & Pillai, K. Chandrasekara. 2010. *Enzyme-less and selective electrochemical sensing of catechol and dopamine using ferrocene bound Nafion membrane modified electrode*. Anal. Methods. Vol. 2. S. 1962-1968. DOI: 10.1039/C0AY00430H.
- Lai, Guo-Song & Zhang, Hai-Li & Han, De-Yan. 2008. *Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of dopamine at a Nafion/carbon-coated iron nanoparticles-chitosan composite film modified electrode*. Microchimica Acta. Vol. 160:1-2. S. 233-239. DOI: 10.1007/s00604-007-0832-x.
- Lee, Kendall H. & Kristic, Katarina & van Hoff, Ryan & Hitti, Frederick L. & Blaha, Charles & Harris, Brent & Roberts, David W. & Leiter, J.C. 2007. *High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus increases glutamate in the subthalamic nucleus of rats as demonstrated by in vivo enzyme-linked glutamate sensor*. Brain Research. Vol. 1162. S. 121-129. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.06.021.
- Li, Xiao-Hua & Xian, Yue-Zhong & Xie, Zong-Hong & Min, Hong & Li, Chen-Xin & Jin, Li-Tong. 2007. *Amperometric Sensor Based on Neutral Red-Doped Silica Nanoparticles Coupled with Microdialysis for the Measurement of Glutamate in the Rat Striatum*. Chinese Journal of Chemistry. Vol. 25. S. 953 - 957.
- Liu, Ai-Lin & Zhang, Shao-Bo & Chen, Wei & Lin, Xin-Hua & Xia, Xing-Hua. 2008. *Simultaneous voltammetric determination of norepinephrine, ascorbic acid and uric acid on polycalconcarboxylic acid modified glassy carbon electrode*. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 23. S. 1488–1495. DOI: 10.1016/j.bios.2008.01.001.
- Loeb, G. E. & Peck, R. A. & Martyniuk, J. 1995. *Toward the ultimate metal microelectrode*. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 63:1-2. S. 175-183. DOI:10.1016/0165-0270(95)00107-7.
- Lotharius, Julie & Brundin, Patrik. 2002. *Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein*. Nature Reviews Neuroscience. Vol. 3. S. 932-942. DOI: 10.1038/nrn983.
- Lowry, John P. & Ryan Michael R. & O'Neill, Robert D. 1998. *Behaviourally induced changes in extracellular levels of brain glutamate monitored at 1 s resolution with an implanted biosensor*. Anal. Commun. Vol. 35. S. 87-89. DOI: 10.1039/A708747K.
- Lu, X & Zhou, J & Lu, W & Liu, Q & Li, J. 2008. *Carbon nanofiber-based composites for the construction of mediator-free biosensors*. Biosens Bioelectron. Vol. 23:8. S. 1236-43.
- Ludwig, K. A. & Uram, J. D. & Yang, J. & Martin, D. C. & Kipke, D. R. 2006. *Chronic neural recordings using silicon microelectrode arrays electrochemically deposited with a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film*. J Neural Eng. Vol. 3:1. S.59-70.
- Mauritz, Kenneth A. & Moore, Robert B. 2004. *State of understanding of Nafion*. Chem. Rev. Vol. 104. S. 4535-4585.

- May, James M. 1999. *Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?* The FASEB Journal. Vol. 13:9. S. 995-1006.
- Mazzei, Franco & Botrè, Francesco & Lorenti, Giampiero & Porcelli, Fernando. 1996. *Peroxidase based amperometric biosensors for the determination of γ -aminobutyric acid*. Analytica Chimica Acta. Vol. 328. S. 41-46.
- McConnell, G. C. & Butera, R. J. & Bellamkonda, R. V. 2009. *Bioimpedance modeling to monitor astrocytic response to chronically implanted electrodes*. J. Neural Eng. Vol. 6. DOI: 10.1088/1741-2560/6/5/055005.
- Melechko, A. V. & Merkulov, V. I. & McKnight, T. E. & Guillorn, M. A. & Klein, K. L. & Lowndes, D. H. & Simpson, M. L. 2005. *Vertically aligned carbon nanofibers and related structures: Controlled synthesis and directed assembly*. Journal of Applied Physics. Vol. 97:041301. DOI: 10.1063/1.1857591.
- Merrill, Daniel R. & Bikson, Marom & Jefferys, John G.R. 2005. *Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols*. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 141. S. 171-198. DOI:10.1016/j.jneumeth.2004.10.020.
- Meyer, RD & Cogan, SF & Nguyen, TH & Rauh, RD. 2001. *Electrodeposited iridium oxide for neural stimulation and recording electrodes*. IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng. Vol. 9:1. S. 2-11. DOI: 10.1109/7333.918271.
- Michael, Adrian C. & Borland, Laura M. 2007. *Electrochemical Methods for Neuroscience*. USA: CRC Press. ISBN: 0-8493-4075-6.
- Muir, Janice L. 1997. *Acetylcholine, Aging, and Alzheimer's Disease*. Pharmacology Biochemistry and Behavior. Vol. 56:4. S. 687-696.
- Murari, K & Thakor, N. & Stanacevic, M. & Cauwenberghs, G. 2004. *Wide-range, picoampere-sensitivity multichannel VLSI potentiostat for neurotransmitter sensing*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. Vol. 6. S. 4063-6.
- Musameh, Mustafa & Wang, Joseph & Merkoci, Arben & Lin, Yuehe. 2002. *Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes*. Electrochemistry Communications. Vol. 4. S. 743-746.
- Naarmann, H. 2000. *Polymers, Electrically Conducting*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. DOI: 10.1002/14356007.a21_429.
- Naini, A. B. & Vontzalidou, E & Côté, L. J. 1993. *Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid*. Clin Chem. Vol. 39:2. S. 247-50.
- Nicholls, John G. & Martin, A. Robert & Wallace, Bruce G. & Fuchs, Paul A. 2001. *From Neuron to Brain, 4th edition*. USA: Sinauer Associates. ISBN: 0-87893-439-1.

- Nisijima, K & Ishiguro, T. 1995. *Cerebrospinal fluid levels of monoamine metabolites and gamma-aminobutyric acid in neuroleptic malignant syndrome*. J Psychiatr Res. Vol. 29:3. S. 233-44. DOI: 10.1016/0022-3956(95)00007-R.
- Norouzi, P. & Faridbod, F. & Rashedi, H. & Ganjali, M. R. 2010. *Flow Injection Glutamate Biosensor Based on Carbon Nanotubes and Pt-Nanoparticles Using FFT Continuous Cyclic Voltammetry*. Int. J. Electrochem. Sci. Vol. 5. S. 1713 – 1725.
- Nyberg, Tobias & Shimada, Akiyoshi & Torimitsu, Keiichi. 2007. *Ion conducting polymer microelectrodes for interfacing with neural networks*. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 160. S. 16-25. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.08.008.
- O'Neill, Robert D. 1994. *Microvoltammetric Techniques and Sensors for Monitoring Neurochemical Dynamics In Vivo*. A Review. Analyst. Vol. 119. S. 767-779. DOI: 10.1039/AN9941900767.
- O'Neill, Robert D. 2005. *Long-Term Monitoring of Brain Dopamine Metabolism In Vivo with Carbon Paste Electrodes*. Sensors. Vol. 5. S. 317-342.
- Pan, Shengtian & Arnold, Mark A. 1996. *Selectivity enhancement for glutamate with a Nafion/glutamate oxidase biosensor*. Talanta. Vol. 43:7. S. 1157-1162. DOI: 10.1016/0039-9140(95)01854-9.
- Park, Jinwoo & Quaiserová-Mocko, Veronika & Pecková, Karolina & Galligan, James J. & Fink, Gregory D. & Swain, Greg M. 2006. *Fabrication, characterization, and application of a diamond microelectrode for electrochemical measurement of norepinephrine release from the sympathetic nervous system*. Diamond & Related Materials. Vol. 15. S. 761 – 772. DOI: 10.1016/j.diamond.2005.11.008.
- Patel, Bhavik Anil & Bian, Xiaochun & Quaiserová-Mocko, Veronika & Galligan, James J. & Swain, Greg M. 2007. *In vitro continuous amperometric monitoring of 5-hydroxytryptamine release from enterochromaffin cells of the guinea pig ileum*. Analyst. Vol. 132. S. 41–47. DOI: 10.1039/b611920d.
- Peters, Jennifer L. & Miner, LeeAnn H. & Michael, Adrian C. & Sesack, Susan R. 2004. *Ultrastructure at carbon fiber microelectrode implantation sites after acute voltammetric measurements in the striatum of anesthetized rats*. Journal of Neuroscience Methods. Vol. 137. S. 9–23. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.02.006.
- Petrovic, Steven. 2000. *Cyclic Voltammetry of Hexachloroiridate(IV): An Alternative to the Electrochemical Study of the Ferricyanide Ion*. The Chemical Educator. Vol. 5:5. S. 231-235. DOI: 10.1007/s00897000416a.
- Prabakar, S. J. Richard & Narayanan, S. Srman. 2009. *Catalytic Oxidation of Dopamine at a Nickel Hexacyanoferrate Surface Modified Graphite Wax Composite Electrode Coated with Nafion*. Electroanalysis. Vol. 21:13. S. 1481–1489. DOI: 10.1002/elan.200804527.

Pumera, Martin & Ambrosi, Adriano & Bonanni, Alessandra & Chng, Elaine Lay Khim & Poh, Hwee Ling. 2010. *Graphene for electrochemical sensing and biosensing*. Trends in Analytical Chemistry. Vol. 29:9. DOI: 10.1016/j.trac.2010.05.011.

Purves, Dale & Augustine, George J. & Fitzpatrick, David & Katz, Lawrence C. & LaMantia, Anthony-Samuel & McNamara, James O. & Williams, S. Mark. 2001. *Neuroscience, 2nd edition*. USA: Sinauer Associates. ISBN-10: 0-87893-742-0.

Rahman, M. M. 2011. *Fabrication of a Highly-sensitive Acetylcholine Sensor Based on AChOx Immobilized Smart-chips*. Sensors & Transducers Journal. Vol. 126:3. S. 11-18. ISSN 1726-5479.

Rayne, Richard C. 1997. *Methods in Molecular Biology, Volume 72: Neurotransmitter methods*. Humana Press. S. 251-257. [viitattu 16.3.2011] Saatavilla: http://books.google.com/books?id=GcCq_XOVG6wC&printsec=frontcover&hl=fi&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Robinson, Donita L. & Hermans, Andre & Seipel, Andrew T. & Wightman, R. Mark. 2008. *Monitoring Rapid Chemical Communication in the Brain*. Chem. Rev. Vol. 108:7. S. 2554–2584. DOI: 10.1021/cr068081q.

Ruhé, H. G. & Mason, N. S. & Schene, A. H. 2007. *Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies*. Molecular Psychiatry. Vol. 12. S. 331–359. DOI: 10.1038/sj.mp.4001949.

Sánchez Arribas, Alberto & Bermejo, Esperanza & Chicharro, Manuel & Zapardiel, Antonio & Luque, Guillermina L. & Ferreyra, Nancy F. & Rivas, Gustavo A. 2006. *Analytical applications of a carbon nanotubes composite modified with copper microparticles as detector in flow systems*. Analytica Chimica Acta. Vol. 577:2. S. 183-189. DOI:10.1016/j.aca.2006.06.055.

Sattarahmady, N. & Heli, H. & Moosavi-Movahedi, A. A. 2010. *An electrochemical acetylcholine biosensor based on nanoshells of hollow nickel microspheres-carbon microparticles-Nafion nanocomposite*. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 25. S. 2329–2335. DOI: 10.1016/j.bios.2010.03.031.

Scholz, Fritz. 2010. *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. Springer. S. 359. ISBN: 9783642029141. [viitattu 6.6.2011] Saatavilla: <http://books.google.com/books?id=9t5nzn32ZPoC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.

Schuvailo, O.M. & Soldatkin, O.O. & Lefebvre, A. & Cespuglio, R. & Soldatkin, A.P. 2006. *Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate*. Analytica Chimica Acta. Vol. 573-574. S. 110-116. DOI: 10.1016/j.aca.2006.03.034.

Sekioka, Naoyuki & Kato, Dai & Kurita, Ryoji & Hirono, Shigeru & Niwa, Osamu. 2008. *Improved detection limit for an electrochemical γ -aminobutyric acid sensor based*

on stable NADPH detection using an electron cyclotron resonance sputtered carbon film electrode. *Sensors and Actuators B*. Vol. 129. S. 442–449. DOI: 10.1016/j.snb.2007.08.040.

Shahrokhian, Saeed & Zare-Mehrjardi, Hamid Reza. 2007. *Application of thionine-nafion supported on multi-walled carbon nanotube for preparation of a modified electrode in simultaneous voltammetric detection of dopamine and ascorbic acid*. *Electrochimica Acta*. Vol. 52:22. S. 6310-6317. DOI: 10.1016/j.electacta.2007.04.023.

Shimomura, Takeshi & Itoh, Tetsuji & Sumiya, Touru & Mizukami, Fujio & Ono, Masatoshi. 2009. *Amperometric biosensor based on enzymes immobilized in hybrid mesoporous membranes for the determination of acetylcholine*. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 45. S. 443–448. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.08.007.

Sommakia, Salah & Rickus, Jenna L. & Otto, Kevin J. 2009. *Effects of adsorbed proteins, an antifouling agent and long-duration DC voltage pulses on the impedance of silicon-based neural microelectrodes*. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. S. 7139-42.

Sun, Wei & Duan, Yuanyuan & Li, Yinzhuo & Zhan, Tianrong & Jiao, Kui. 2009. *Electrochemistry and Voltammetric Determination of Adenosine with N-Hexylpyridinium Hexafluorophosphate Modified Electrode*. *Electroanalysis*. Vol. 21:24. S. 2667–2673. DOI: 10.1002/elan.200900256.

Szarowski, D. H. & Andersen, M. D. & Retterer, S. & Spence, A. J. & Isaacson, M. & Craighead, H. G. & Turner, J. N. & Shain, W. 2003. *Brain responses to micro-machined silicon devices*. *Brain Research*. Vol. 983:1-2. S. 23-35. DOI:10.1016/S0006-8993(03)03023-3.

Tang, Hao & Chen, Jinhua & Yao, Shouzhao & Nie, Lihua & Deng, Guohong & Kuang, Yafei. 2004. *Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode*. *Analytical Biochemistry*. Vol. 331:1. S. 89-97. DOI:10.1016/j.ab.2004.05.005.

Tortora, Gerard J. & Derrickson, Bryan. 2009. *Principles of Anatomy and Physiology: Volume 1: Organization, Support and Movement, and Control Systems of the Human Body, 12th edition*. Asia: John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0470-39495-3.

Treiman, David M. 2001. *GABAergic Mechanisms in Epilepsy*. *Epilepsia*. Vol. 42:Suppl. 3. S. 8–12. DOI: 10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3008.x.

Tsukatani, Tadayuki & Matsumoto, Kiyoshi. 2005. *Sequential fluorometric quantification of γ -aminobutyrate and l-glutamate using a single line flow-injection system with immobilized-enzyme reactors*. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 546. S. 154–160. DOI: 10.1016/j.aca.2005.05.053.

Turner, J. N. & Shain, W. & Szarowski, D. H. & Andersen, M. & Martins, S. & Isaacson, M. & Craighead, H. 1999. *Cerebral Astrocyte Response to Micromachined Silicon Implants*. *Experimental Neurology*. Vol. 156:1. S. 33-49. DOI: 10.1006/exnr.1998.6983.

- UBC. 2003. *Biological Applications of pH*. [verkkodokumentti] The University of British Columbia. [viitattu 29.4.2011] Saatavilla: <http://www.chem.ubc.ca/courseware/pH/section19/index.html>.
- Vaidya, R. & Atanasov, P. & Wilkins, E. 1995. *Effect of interference on the performance of glucose enzyme electrodes using Nafion® coatings*. Medical Engineering & Physics. Vol. 17:6. S. 416-424. DOI: 10.1016/1350-4533(94)00006-U.
- Vamvakaki, Vicky & Tsagaraki, Katerina & Chaniotakis, Nikos. 2006. *Carbon Nanofiber-Based Glucose Biosensor*. Anal. Chem. Vol. 78. S. 5538-5542.
- Wang, Huai-Sheng & Li, Tian-Hua & Jia, Wen-Li & Xu, Hong-Yan. 2006. *Highly selective and sensitive determination of dopamine using a Nafion/carbon nanotubes coated poly(3-methylthiophene) modified electrode*. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 22. S. 664–669. DOI: 10.1016/j.bios.2006.02.007.
- Wang, Joseph. 2005. *Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review*. Electroanalysis. Vol. 17:1. DOI: 10.1002/elan.200403113.
- Wang, Jun & Lin, Yuehe. 2008. *Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications*. Trends in Analytical Chemistry. Vol. 27:7.
- Wassum, Kate M. & Tolosa, Vanessa M. & Wang, Jianjun & Walker, Eric & Monbouquette, Harold G. & Maidment, Nigel T. 2008. *Silicon Wafer-Based Platinum Microelectrode Array Biosensor for Near Real-Time Measurement of Glutamate in Vivo*. Sensors. Vol. 8. S. 5023-5036. DOI: 10.3390/s8085023.
- Wessler, Ignaz & Roth, Elisabeth & Deutsch, Carola & Brockerhoff, Peter & Bittinger, Fernando & Kirkpatrick, Charles James & Kilbinger, Heinz. 2001. *Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters*. Br J Pharmacol. Vol. 134:5. S. 951–956. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704335.
- White, Henry S. & Leddy, Johna & Bard, Allen J. 1982. *Polymer films on electrodes. 8. Investigation of charge-transport mechanisms in Nafion polymer modified electrodes*. J. Am. Chem. Soc. Vol. 104:18. S. 4811–4817. DOI: 10.1021/ja00382a013.
- WHO. 2004. *Atlas: country resources for neurological disorders*. [verkkodokumentti] WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 924156283. [viitattu 20.7.2011] Saatavilla: http://www.who.int/mental_health/neurology/neurogy_atlas_lr.pdf.
- WHO. 2011. *Disorders Management*. [verkkodokumentti] WHO. [viitattu 20.7.2011] Saatavilla: http://www.who.int/mental_health/management/en/.
- Wightman, R. M. & May, L. J. & Michael, A.C. 1988. *Detection of dopamine dynamics in the brain*. Anal Chem. Vol. 60:13. S. 769A-779A. DOI: 10.1021/ac00164a001.
- Wright, Alan F. & Rudan, Igor & Hastie, Nicholas D. & Campbell, Harry. 2010. *A 'Complexity' of Urate Transporters*. Kidney International. Vol. 78:5. S. 446-452.

Wu, Lina & Zhang, Xueji & Ju, Huangxian. 2007. *Detection of NADH and Ethanol Based on Catalytic Activity of Soluble Carbon Nanofiber with Low Overpotential*. Anal. Chem. Vol. 79:2. S. 453-458.

Xiang-Qin, Lin & Guang-Feng, Kang & Ying, Chai. 2008. *A Nafion and Choline Bi-layer Modified Carbon Fiber Electrode for In-vivo Detection of Dopamine in Mouse Cerebrum*. Chinese Journal of Analytical Chemistry. Vol. 36:2. S. 157-161. DOI: 10.1016/S1872-2040(08)60016-X.

Xiao, Yinghong & Cui, Xinyan & Hancock, Jessica M. & Bouguettaya, Mohamed & Reynolds, John R. & Martin, David C. 2004. *Electrochemical polymerization of poly(hydroxymethylated-3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT-MeOH) on multichannel neural probes*. Sensors and Actuators B: Chemical. Vol. 99:2-3. S. 437-443. DOI: 10.1016/j.snb.2003.12.067.

Yang, Junyan & Martin, David C. 2004. *Microporous conducting polymers on neural microelectrode arrays: II. Physical characterization*. Sensors and Actuators A: Physical. Vol. 113:2. S. 204-211. DOI: 10.1016/j.sna.2004.02.029.

Yang, Junyan & Kim, Dong Hwan & Hendricks, Jeffrey L. & Leach, Michelle & Northey, Rebecca & Martin, David C. 2005. *Ordered surfactant-templated poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) conducting polymer on microfabricated neural probes*. Acta Biomaterialia. Vol. 1:1. S. 125-136. DOI: 10.1016/j.actbio.2004.09.006.

Young In. 2005. *Potentiostat*. [verkkodokumentti] Young In Scientific Co., Ltd. [viitattu 10.5.2011] Saatavilla: <http://www.youngin.com/AppAppView.aspx?Type=AM&AppArtID=2911>.

Zhang, Hai-Li & Liu, Ya & Lai, Guo-Song & Yu, Ai-Min & Huang, Yu-Mei & Jin, Chuan-Ming. 2009. *Calix[4]arene crown-4 ether modified glassy carbon electrode for electrochemical determination of norepinephrine*. Analyst. Vol. 134. S. 2141-2146.

Zhao, Hong & Bian, Xiaochun & Galligan, James J. & Swain, Greg M. 2010. *Electrochemical measurements of serotonin (5-HT) release from the guinea pig mucosa using continuous amperometry with a boron-doped diamond microelectrode*. Diamond & Related Materials. Vol. 19. S. 182-185. DOI: 10.1016/j.diamond.2009.10.004.

Liitteet

Liite 1: Mittaukset ensimmäisillä elektrodeilla

Taulukko 12. Mittaukset ensimmäisillä elektrodeilla.

Mittaus- kerta	PBS-liuos (lisätyn aineen määrä / 900 ml)	Työ- elektrodi			Vasta- elektrodi		Elektrodien sijainti kennossa	Parametrierot (Eri parametrien kokeilua. Mittauksen perusteella <u>valitut</u> .)
		1A- 1	1B	1C	1A- 2	1A- 3		
1	100 µM AA (15,9 mg)			x	x		keskellä vierekkäin	Lepoaika <u>1</u> / 2 s, Pyyhkäisynopeus 10 / <u>50</u> mv/s, Pulssin leveys <u>20</u> / 40 ms, Askelkorkeus <u>1</u> / 2 mV
2	1000 µM AA (158,5 mg)			x	x		keskellä vierekkäin	
3	ei lisättyä		x		x		keskellä vierekkäin	
			x		x		keskellä vierekkäin	Jakeluverkkosuodatin on / off
		x				x	keskellä vierekkäin	Jakeluverkkosuodatin on / off
		x				x	reunoilla, vastakkaisilla puolilla	Jakeluverkkosuodatin on / <u>off</u>

Taulukko 13. Valitut mittausparametrit ja perustelut valinnalle.

Parametri	Käytetty arvo	Perustelut arvon valinnalle
Näytteenottojakso (engl. <i>sampling period</i>)	20 ms	50 Hz:n jakeluverkkokoalueella suositellaan käytettävän näytteenottojaksona 1/50 Hz = 20 ms kerrannaisia (Duckworth, 1999).
Pulssin leveys (engl. <i>pulse width</i>)	20 ms	Yleensä asetetaan välille 5 – 100 ms (Duckworth, 1999).
Jakeluverkkosuodatin (engl. <i>mains filter</i>)	off	Näytteenottojakson asettamisella 20 ms:iin tai sen kertoimeksi, jakeluverkon aiheuttamat häiriöt saadaan poistettua tehokkaasti. Siksi suodatinta ei käytetty enää lisänä.
Tiedon keruu nopeus (engl. <i>speed</i>)	10 kHz	10 kHz (Duckworth, 1999).
Alku- ja loppujännite (engl. <i>initial and final ramp</i>)	-600	Valittu muiden artikkelien perusteella. Tärkeää olla muussa kohdassa kuin missä odotetaan hapettumista tai pelkistymistä tapahtuvan (Duckworth, 1999).
Askelkorkeus (engl. <i>height</i>)	1 mV	1-2 mV ideaali (Duckworth, 1999).
Pyyhkäisynopeus (engl. <i>scan rate</i>)	50 mv/s	Valittu muiden artikkelien perusteella.
Lepoaika (engl. <i>rest time</i>)	1 s	Yleensä 1-60 s (Duckworth, 1999). Ero lyhyemmän ja pitemmän välillä näkyi vain aukkona käyrän alku- ja loppupäiden välillä.

Liite 2: Elektrodien keskimääräiset pinta-alat

Taulukko 14. Elektrodien pinta-alan laskemiseen käytetyt arvot.

	Pinnoite 1,0 μm	Pinnoite 2,0 μm	Korkeus (mm)	Säde (mm)	Pinta-ala (cm ²)
2A			26,600	0,189	0,3170
1A-1			15,250	0,190	0,1832
1A-2			14,850	0,185	0,1737
2B-1	x		16,801	0,190	0,2017
2B-2	x		17,101	0,190	0,2053
2C-1		x	18,002	0,191	0,2172
2C-2		x	16,602	0,191	0,2004

Taulukossa 14 esitettyihin korkeuden ja säteen arvoihin on lisätty Nafion-pinnoitteen arvioidut paksuudet (1,0 ja 2,0 μm). Suoran ympyrälieriön muotoisen kappaleen vaipan ja yhden pohjan yhteenlaskettu pinta-ala on:

$$A = 2\pi rh + \pi r^2,$$

jossa r on pohjan säde ja h sylinterin korkeus.